

Aus dem
Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

**Korrelation der zellulären Immunität mit der
Tumorzell dissemination und dem Differenzierungsgrad
des invasiven Mammakarzinoms**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Amr, Nermien

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Seeger

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 20.04.2021

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	I
II. Abbildungsverzeichnis	III
III. Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Prognose.....	3
1.1.4 Tumorzelldissemination.....	5
1.2 Interaktion Tumor und Immunsystem.....	6
1.2.1 Das Prinzip der Immunüberwachung.....	6
1.2.2 Zellen der Immunabwehr.....	6
1.2.3 Die Bedeutung von CD28.....	7
1.2.4 Die TCR ζ -Kette.....	9
1.2.5 Apoptose Mechanismen.....	10
1.2.6 Die Rolle der Natürlichen Killerzellen.....	11
1.3 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Patientenkollektiv.....	17
2.1.2 Laborausstattung.....	18
2.1.3 Geräte.....	19
2.1.4 Software.....	19
2.1.5 Chemikalien.....	19
2.1.6 Antikörper.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Detektion der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.....	22
2.2.2 Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut.....	24
2.2.3 Analyse der Lymphozytensubpopulationen in Blut und Knochenmark mittels Durchflusszytometrie.....	25
2.2.4 Statistische Methoden.....	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Klinische und pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs	32
3.2	Korrelation des Differenzierungsgrades des Tumors mit klinischen und pathologischen Charakteristika sowie mit der Tumorzell dissemination	34
3.3	Häufigkeit des Auftretens von disseminierten Tumorzellen im gesamten Patientenkollektiv	36
3.4	Korrelation des Auftretens von DTCs (disseminierten Tumorzellen im Knochenmark) mit klinischen und pathologischen Charakteristika	36
3.5	Korrelation des Auftretens von CTCs (disseminierte Tumorzellen im Blut) mit klinischen und pathologischen Charakteristika	38
3.6	Verteilung der Differenzierungsgrade im gesamten Patientenkollektiv	40
3.7	Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut in Abhängigkeit des Tumorgradings	40
3.7.1	Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut zwischen Patienten mit G1 und G2 Tumor	40
3.7.2	Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut bei Patienten mit gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1+G2) und Patienten mit wenig differenzierten Tumoren (G3)	42
3.8	Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Knochenmark in Abhängigkeit des Tumorgradings	44
3.9	Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Knochenmark	46
3.10	Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Knochenmark in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Knochenmark	48
4	Diskussion	50
4.1	Immunosurveillance in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums	50
4.1.1	Phasen der Immunosurveillance	51
4.1.2	NK-Zellaktivität	53
4.1.3	T-Lymphozyten-Aktivität	57

4.2	Das Grading und die Tumorzell dissemination	58
4.2.1	Triple Negative Tumore	58
4.2.2	Tumorzell dissemination	59
4.2.3	Die TCR ζ -Expression	62
4.3	Beeinflussung der zellulären Immunität im peripheren Blut und Knochenmark	64
5	Zusammenfassung und Ausblick	65
6	Literaturverzeichnis	68
7	Erklärung zum Eigenanteil	72
8	Danksagung	73

I. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity (antikörperabhängige Zytotoxizität)
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BRCA	Breast cancer gene (Brustkrebsgen)
BCL-XL	B-cell Lymphoma-extra large
CD	Cluster of differentiation
CK	Cytokeratin
CTC	Circulating tumor cells (zirkulierende Tumorzellen im Blut)
DTC	Disseminated tumor cells (disseminierte Tumorzellen im Knochenmark)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogen
FACS	Fluorescence activated cell sortiny (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoreszein Isothicyanat
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormonrezeptor
HPF	High-power field
IL-2	Interleukin 2
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor (Killerzellen-Immunoglobulin-ähnlicher Rezeptor)
KLR	Killer cell lectin-like receptor (Killerzellen-Lektin-ähnlicher Rezeptor)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MICA	MHC-Class I Polypeptide-Rellted Sequence A
MICB	MHC-Class I Polypeptide-Related Sequence B

NCR	Natural cytotoxicity receptor (natürlicher zytotoxischer Rezeptor)
NK	Natural killer
NKG2D	C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor der Natürlichen Killerzelle
PALPB2	Partner and localizer of BRCA2
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferete Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanine
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PGE2	Prostaglandin E2
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PR	Progesteron
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
TCR	T-Cell-Receptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	Tumornekrosefaktor
ULBP	UL-16-Binding Protein

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Folgen der Aktivierung der T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen (APZ)	8
Abbildung 2:	Aktivierung und Hemmung der NK-Zellen.....	15
Abbildung 3:	Punktwolkendarstellung unter Gegenüberstellung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen	29
Abbildung 4:	Gating der Lymphozytensubpopulation.....	29
Abbildung 5:	Punktwolkendarstellung im Lymphozytengate mit Quadrantstatistikmarker bei Gegenüberstellung von CD3 und CD4.....	30
Abbildung 6:	Quadrantstatistik.....	31

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Grading nach Bässler [19].....	4
Tabelle 2:	Klinische und pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs	33
Tabelle 3:	Klinische und pathologische Charakteristika	35
Tabelle 4:	Klinische und pathologische Charakteristika in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Knochenmark.....	37
Tabelle 5:	Klinische und pathologische Charakteristika in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Blut (CTC negativ vs. CTC positiv)	39
Tabelle 6:	Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μ l Blut bei Patientinnen mit einem G1 Tumor im Vergleich zu Patientinnen mit einem G2 Tumor	41
Tabelle 7:	Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μ l Blut bei Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit G3 Tumoren.....	43
Tabelle 8:	Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μ l KM bei Patientinnen mit G1 Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit G2 Tumoren	44
Tabelle 9:	Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μ l Knochenmark bei Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit G3 Tumoren.....	45
Tabelle 10:	Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μ l Blut bei Patientinnen ohne Tumorzell dissemination im Vergleich zu Patientinnen mit Tumorzell dissemination	47
Tabelle 11:	Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μ l Blut bei Patientinnen ohne Tumorzell dissemination im Vergleich zu Patientinnen mit Tumorzell dissemination	49

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Die Zahl der neu an Brustkrebs erkrankten Frauen im Jahr 2016 betrug 71640 und wird für das Jahr 2020 auf 77600 geschätzt [1]. Somit stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau dar [2].

Das Risiko, dass eine Frau im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom erkrankt, liegt bei 12% [2].

Die Zunahme der Neuerkrankungen fand hauptsächlich bei postmenopausalen Frauen statt, im Jahr 2012 besonders in der Altersgruppe der 65- bis 70-jährigen Frauen. Jedoch befanden sich auch 3 von 10 neuerkrankten Frauen unter dem Lebensalter von 55 Jahren [2].

Mit der Einführung des Mammographie Screenings im Jahr 2005 wurde eine hohe Neuerkrankungsrate registriert, was darauf zurückzuführen ist, dass viele Erkrankungen durch das Mammographie Screening deutlich früher diagnostiziert wurden [2].

Der Anteil, der an den Folgen von Brustkrebs verstorbenen Frauen an der Gesamttodesrate aller Frauen in Deutschland betrug im Jahr 2012 3,9% [3].

Mit 17 748 Todesfällen im Jahr 2012 ist somit das Mammakarzinom nach den Herz-Kreislaufsystem Erkrankungen die viert häufigste Todesursache [2].

Trotz der gestiegenen Zahl der Neuerkrankungen sterben dennoch auf Grund der fortgeschrittenen Therapiemöglichkeiten heute weniger Patientinnen an Brustkrebs als vor 10 Jahren [2].

1.1.2 Ätiologie

Die genauen ätiologischen Faktoren zur Entwicklung des Mammakarzinoms sind bisher noch ungeklärt. Man vermutet eine multifaktorielle Pathogenese.

Ein bedeutsamer Faktor, der das Risiko am Mammakarzinom zu erkranken relevant erhöht, ist das zunehmende Alter.

So erkrankt im Alter von 90 Jahren bereits jede fünfte Frau an Brustkrebs [4]. Dahingegen sind nur weniger als 10 von 100000 Erkrankten unter 25 Jahre alt [4].

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Dauer der reproduktiven Phase der Frau. Bei früh einsetzender Menarche oder später Menopause ist der Zeitraum, in dem die Frau den auf die Brustdrüse potentiell krebsbegünstigend wirkenden Sexualhormonen ausgesetzt ist, verlängert, und somit das Brustkrebsrisiko erhöht [4]. Peri- und postmenopausale Hormontherapien haben durch die künstliche Zufuhr der Sexualhormone Östrogen und Progesteron denselben zu erwartenden Effekt [5].

Einen weiteren Risikofaktor stellt das familiär gehäufte Auftreten des Mammakarzinoms dar. Dies könnte auf die Vererbung des mutierten BRCA-1- oder BRCA-2-Gens zurückgeführt werden. So liegt die Wahrscheinlichkeit am Mammakarzinom zu erkranken bei einer 70-jährigen Frau mit mutiertem BRCA-1-Gen bei 57%, bei einer 80-jährigen Frau sogar bei 81% [6]. Eine Mutation am BRCA-2-Gen erhöht das Risiko einer 80-Jährigen an Brustkrebs zu erkranken auf 83% [6].

Eine Mutation des Genabschnittes, welches für das PALB2-Protein codiert, kann ebenfalls zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko führen [7]. Die Mutation verhindert die zur Tumorsuppression erforderliche Interaktion dieses Proteins mit dem BRCA2-Gen [7]. Personen, die von solch einer Mutation betroffen sind, haben ein um das 9,5-fache gesteigertes Risiko an Brustkrebs zu erkranken [7]. Das Erkrankungsrisiko einer 70-jährigen Trägerin dieses mutierten Gens liegt bei 35% [7].

Auch der regelmäßige Alkoholkonsum wird zu den Risikofaktoren gezählt [4]. Außerdem scheinen auch umweltabhängige Faktoren das Brustkrebsrisiko zu erhöhen. Beispielsweise sollen mangelnde Bewegung oder fettreiche Nahrung das Krebsrisiko steigern. Hintergrund hierfür ist das durch die vermehrte Aufnahme von Fetten resultierende erhöhte Angebot an Cholesterin, welches ein Grundelement der Synthese der potentiell krebsbegünstigend wirkenden Sexualhormone darstellt [8].

1.1.3 Prognose

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren für den Verlauf der Erkrankung ist der Lymphknotenbefall. Je ausgeprägter dieser ist, desto schlechter ist die Prognose für die Überlebenszeit der Patientin bzw. desto höher ist die Gefahr des Auftretens eines Rezidivs oder von Metastasen [9]. Auch die Primärtumorgröße ist ein bedeutsamer Prognosefaktor, da man annimmt, dass das Ausmaß des Lymphknotenbefalls hiervon abhängig ist. Somit ist die Prognose mit steigender Primärtumorgröße schlechter [9].

Histologisch ist es möglich, das Mammakarzinom in verschiedene Subtypen einzuteilen, welche sich prognostisch unterschiedlich verhalten [10].

Die Subtypen unterscheiden sich unter anderem in der Expression von Hormonrezeptoren (HR) und dem HER2/neu-Rezeptor. Die Expression von HR wird als prognostisch positiv gewertet, da bei diesen Tumoren ein gutes Ansprechen auf antihormonelle Therapien vorliegt [11]. Die Lebenszeit nach Diagnose der Erkrankung erwies sich bei Patientinnen, deren Tumor sowohl ER- und PR-Rezeptoren, als auch HER2/neu exprimierte, als länger als bei Patientinnen, bei denen keine Expression der Rezeptoren vorlag [12]. Die Expression von HER2/neu galt vor der Einführung der Therapie mit dem gegen HER2/neu gerichteten monoklonalen Antikörper Trastuzumab im Jahr 1998 als negativer Prognosefaktor [12, 13]. Damals galt der HR+/HER2/neu+ Subtyp als prognostisch ungünstiger als HR+/HER2/neu- [14]. Mit der Einführung der gegen HER2/neu-gerichteten Therapie erwies sich die Lebenszeit nach Diagnose bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom des HR+/HER2/neu+ Subtypen als länger als bei Patientinnen mit dem HR+/HER2/neu- Subtyp [12]. Somit ist der HR+/HER2/neu+ Subtyp im Hinblick auf die jetzigen Therapiemöglichkeiten als prognostisch günstiger anzusehen [12]. Tumore, die, weder Hormonrezeptoren, noch HER2/neu exprimieren, werden als Triple-negative Tumore bezeichnet. Bei dem HR-/HER2/neu- Subtyp liegt die geringste Lebenszeit nach Diagnose vor [12]. Er zeichnet sich klinisch durch vermehrte Aggressivität und Invasivität aus [15].

Der Nachweis einer Streuung über die Blut- oder Lymphbahn zählt ebenfalls zu den negativen Prognosefaktoren [9].

Ein weiterer prognostischer Faktor, aus dem eine Abschätzung der Invasivität des Tumors möglich ist, ist das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut [16]. Das Vorhandensein von Tumorzellen im Knochenmark bedeutet jedoch nicht zwingend, dass es zu einer Ausbildung von Metastasen kommt. Umgekehrt werden bei Patientinnen mit Metastasen nicht immer disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen [17]

(s. Kapitel 1.1.4).

Weiterhin kann anhand des Gradings eine prognostische Aussage getroffen werden. Das Grading-System nach Bässler gibt Auskunft über den jeweiligen Differenzierungsgrad des Tumors. Anhand der Kriterien Tubulusausbildung, Mitoserate und Kernpolymorphie wird ein Score berechnet. Der Tumor gilt als umso undifferenzierter, je höher die so errechnete Punktezahl ausfällt. So gilt ein G1 Tumor als gut differenziert und somit gering maligne, während ein G3 Tumor als schlecht differenziert und hochmaligne eingestuft werden kann [18].

Tabelle 1: Grading nach Bässler [19]

Grading System nach Bässler:

	Score
Tubulusausbildung	
>75%	1
10-75%	2
<10%	3
Kernpolymorphie	
gering	1
mittelgradig	2
stark	3
Mitoserate	
0-1/HPF* (0-10/10 HPF)	1
1-2/HPF (11-20/10 HPF)	2
>2/HPF (>20/10 HPF)	3

Summe:

Score 3-5: Grading **G1**: gut differenziert, gering maligne

Score 6-7: Grading **G2**: mäßig differenziert, mäßig maligne

Score 8-9: Grading **G3**: schlecht differenziert, hoch maligne

* HPF= High-power field

1.1.4 Tumorzelldissemination

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit sich aus dem Primärtumorzellverband zu lösen. Hierdurch können sie entweder indirekt über das lymphatische System, oder direkt in das Blutsystem gelangen. Tumorzellen, die im Blut zirkulieren, werden als zirkulierende Tumorzellen bezeichnet (CTCs, engl. circulating tumor cells) [20]. Tumorzellen, die sich in anderen Organen wie z. B. im Knochenmark niederlassen, werden als disseminierte Tumorzellen bezeichnet (DTCs, engl. disseminated tumor cells) [20]. Es wird angenommen, dass das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen eine der Ursachen für die Entstehung von Fernmetastasen darstellt. Nach Ansiedlung der disseminierten Zellen im jeweiligen Organ, sollen diese, unter noch nicht vollständig erforschten Bedingungen, beginnen zu proliferieren [20]. Diese Zellen könnten den Ursprung einer Metastase darstellen [20]. Andererseits sind auch bei 20-40% der Patientinnen, die weder klinisch noch histopathologisch Anzeichen von Metastasen vorweisen, disseminierte Tumorzellen nachweisbar [17].

Dies ist auf die Annahme zurückzuführen, dass disseminierte Zellen anstatt zu proliferieren in der G₀-Phase des Zellzyklus verbleiben und sich nicht teilen.

Die Zellen befinden sich somit in einer Ruhephase und werden auch als schlafende Zellen bezeichnet (engl. tumor cell dormancy) [21]. Schlafende Zellen können aber nach einiger Zeit wieder in den aktiven Zustand übergehen und werden für das Auftreten von Metastasen und den erneuten Krankheitsausbruch, auch Jahre nach Diagnose des Primärtumors, verantwortlich gemacht [22]. Trotzdem werden bei manchen Patienten selbst 20 Jahre nach Therapie des Primärtumors keine Metastasen oder Rezidive diagnostiziert, obwohl disseminierte Zellen vorhanden waren. Man spricht hierbei von dem sogenannten lebenslangen Tumorzellschlaf (engl. longlife tumor cell dormancy) [23].

Die meisten disseminierten Zellen gehen jedoch in die Apoptose über. Hierbei erfolgt der programmierte Zelltod durch eine intrazelluläre Signalkaskade, die schließlich zu einer Fragmentierung der Zellbestandteile und somit zum Tod der Zelle führt. Dies ist auch eine Erklärung dafür, warum bei Patientinnen mit disseminierten Zellen nicht immer eine Metastasierung auftritt [24].

1.2 Interaktion Tumor und Immunsystem

1.2.1 Das Prinzip der Immunüberwachung

Die Fähigkeit des Immunsystems, transformierte und maligne Zellen zu detektieren und zu eliminieren, wird als Immunüberwachung bezeichnet [25].

Hierbei können natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Lymphozyten durch spezielle Rezeptoren spezifische oder veränderte Oberflächenantigene erkennen und auf diese reagieren [25].

Der Vorgang des Erkennens einer modifizierten oder bösartigen Zelle wird über Interaktionen von auf Immunzellen exprimierten hemmenden und aktivierenden Rezeptoren und den darauffolgenden Signalkaskaden gesteuert [26].

Das Versagen der Immunüberwachung wird auf das Fehlen bzw. eine Dysfunktion dieser Rezeptoren zurückgeführt. Eine Störung der Immunüberwachung erhöht somit das Risiko einer unkontrollierten Vermehrung maligner Zellen.

Durch das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bzw. disseminierten Zellen im Knochenmark ist nicht nur eine lokale, sondern auch eine systemische Interaktion der Immunzellen mit den Tumorzellen möglich.

1.2.2 Zellen der Immunabwehr

Die Immunabwehr kann in eine spezifische und eine unspezifische Immunabwehr gegliedert werden. Bei der unspezifischen Immunantwort wird unabhängig von Antigenen immer dieselbe Immunantwort ausgelöst, während es bei der spezifischen Immunantwort über die T-Lymphozyten zu einer gezielten und auf das jeweilige Antigen abgestimmten Immunantwort kommt.

Eine Hauptrolle bei der spezifischen Immunabwehr des Organismus spielen die Lymphozyten. Diese lassen sich aufgrund ihres Reifungsortes in zwei Untergruppen gliedern. Zum einen in die B-Lymphozyten, deren Differenzierung im Knochenmark (engl. bone marrow) stattfindet, und zum anderen in die T-Lymphozyten, welche im Thymus reifen [27].

Vor allem T-Lymphozyten sind an der Immunüberwachung beteiligt und lassen

sich aufgrund der Expression des Oberflächenmoleküls CD3 von den B-Lymphozyten unterscheiden [27]. CD3 ist in der Lage mit den nur auf T-Lymphozyten exprimierten und Antigen-spezifischen TCR-Rezeptoren (engl. T-Cell Receptor) zu interagieren und somit den T-Lymphozyten zu aktivieren [27]. Innerhalb der Gruppe der T-Lymphozyten kann auf Grund der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 weiter unterteilt werden. CD4-positive, sogenannte T-Helferzellen, dienen der Regulation und Aktivierung weiterer Schritte der Immunantwort, während CD8-positive, sogenannte zytotoxische T-Zellen, in der Lage sind, direkt auch gegen befallene körpereigene Zellen vorzugehen [27].

1.2.3 Die Bedeutung von CD28

Zur optimalen Aktivierung und weiteren Differenzierung der T-Lymphozyten ist die Interaktion der auf den Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ) exprimierten Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 mit dem auf den T-Zellen exprimierten Oberflächenmolekül CD28 essentiell [28]. Erfolgt keine Kostimulation der T-Lymphozyten über CD28, werden die T-Lymphozyten in ein hyporesponsives Stadium überführt und können hierdurch nicht mehr aktiviert werden [29].

Das Ausbleiben der Kostimulation führt außerdem zu einer Blockade der Interleukin 2-Sezernierung [30]. Diese ist notwendig, um weitere Immunzellen zu aktivieren. Ihr Ausbleiben schwächt die Immunantwort zusätzlich [30].

IL-2 wird auch zu den Faktoren gezählt, die die Überlebenschance der T-Lymphozyten erhöhen und somit vor Apoptose schützen [31]. Durch fehlende Stimulation über CD28 und somit dem Ausbleiben der IL-2-Produktion fehlt dieser Schutzmechanismus und die T-Lymphozyten gehen in die Apoptose über. Ein weiterer Hinweis für die Apoptose-Schutzfunktion ist die bei den T-Lymphozyten nach CD28-Stimulation einsetzende vermehrte Expression des BCL-XL-Proteins, welches in der Lage ist die T-Lymphozyten vor der Apoptose über den CD95 Weg zu schützen [30] (s. Kapitel 2.4).

Gruber et al. zeigten, dass bei Patientinnen mit Mammakarzinom die Zahl der

zytotoxischen T-Lymphozyten, die CD28 exprimieren, im Vergleich zu gesunden Patientinnen erniedrigt ist [29].

Hiernach liegt der Verdacht nah, dass die verminderte Expression von CD28 und die daraus resultierende verminderte T-Zell-Antwort und Apoptose der T-Zellen, sowie die verminderte Aktivierung anderer Immunzellen über Interleukin 2, zur Einschränkung des Immunsystems und somit zur Einschränkung der Tumorzellbekämpfung führen könnte.

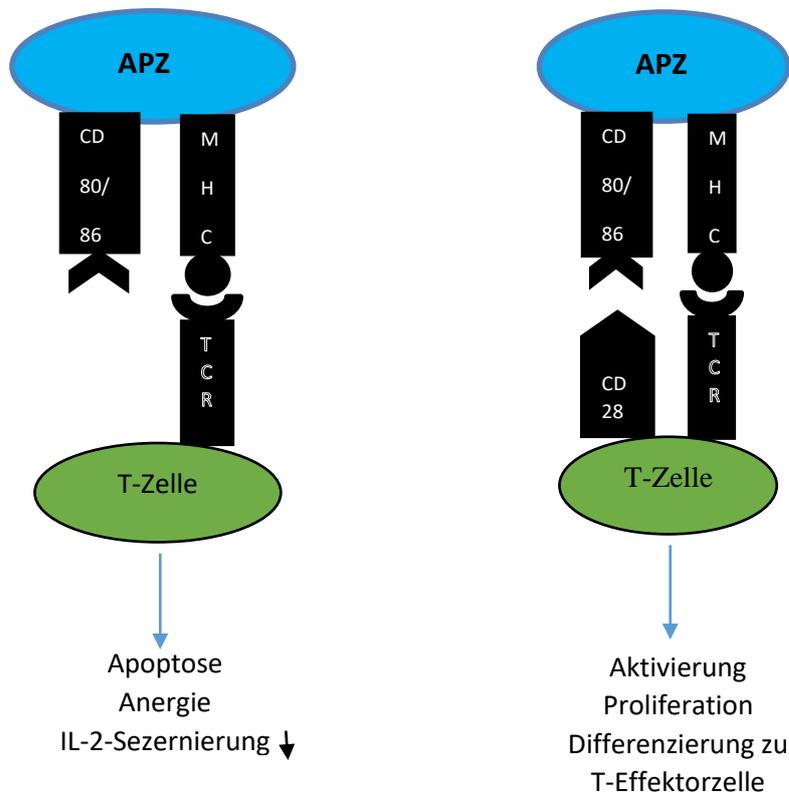


Abbildung 1: Folgen der Aktivierung der T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen (APZ)

1.2.4 Die TCR ζ -Kette

Über den T-Zell-Rezeptor ist es dem T-Lymphozyten möglich, das Antigen, welches über MHC-II-Proteine der APZ präsentiert wird, zu erkennen [27].

Hieraus erfolgt die anschließende Aktivierung des T-Lymphozyten.

Der T-Zell-Rezeptor ist aus einem TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimer, einem TCR ζ -Homodimer und CD3- $\gamma\epsilon$ - und CD3- $\delta\epsilon$ -Heterodimeren aufgebaut [32].

Das TCR ζ -Homodimer besteht aus einer kurzen Extrazellulärdomäne aus neun Aminosäuren, einer Transmembranregion und einer langen zytoplasmatischen Kette [32].

TCR ζ ist nicht nur im T-Zell-Rezeptorkomplex vorzufinden, sondern ist auch eine Komponente der aktivierenden Rezeptoren Nkp46, Nkp30 und CD16, die auf NK-Zellen exprimiert werden [33].

Die lange zytoplasmatische Kette enthält 3 Aktivierungsdomänen. Diese werden bei Stimulation des T-Zell-Rezeptors Tyrosin-abhängig phosphoryliert und aktivieren hierdurch eine Signalkaskade, die letztendlich zur Aktivierung des T-Lymphozyten führt [34].

Bei fehlender Expression der ζ -Kette ist die Aktivierung der T-Lymphozyten über den TCR-Rezeptor nicht mehr möglich [35].

Bei Brustkrebspatientinnen konnte eine Verminderung der ζ -Ketten-Expression der T-Lymphozyten im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Patientinnen verzeichnet werden [29]. Die Expression der ζ -Kette erwies sich umso geringer, je näher sich die T-Lymphozyten am Tumor befanden und, je fortgeschrittener das Tumorstadium war [33]. De Boniface et al. konnten nachweisen, dass sich die Expressionswerte nach chirurgischer Entfernung des Tumors wieder den Werten gesunder Patienten näherten [33].

Somit ist eine Beeinflussung der ζ -Ketten-Expression durch Tumorzellen anzunehmen. Der Tumor hat dadurch die Fähigkeit, sich der Immunabwehr durch Störung der T-Zell-Aktivierung zu entziehen [33].

1.2.5 Apoptose Mechanismen

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein physiologischer Vorgang. Durch eine Signalkaskade, bei der unter anderem die Proteine Bax und Bad sowie Caspasen eine entscheidende Rolle spielen, kommt es schrittweise zu einer Fragmentierung der jeweiligen Zelle und führt somit zu ihrem Tod [36]. Die Apoptose dient unter anderem dazu, die Anzahl der Zellen und somit die Größe von Geweben konstant zu halten, aber auch zur Selektion von veränderten und malignen Zellen [36].

Die Apoptose kann durch interne Signale und durch externe Botenstoffe ausgelöst werden. Zu den Apoptose-Mechanismen, die durch externe Signale eingeleitet werden, gehört der Fas / FasL Signalweg. Dieser Mechanismus dient auch der Regulation einer überschießenden Immunreaktion.

Der Fas-Rezeptor gehört zur Familie der Tumor-Nekrose Faktoren (TNF) und wird auch als CD95 Oberflächenmolekül bezeichnet [37]. Bei Interaktion mit dem für diesen Rezeptor spezifischen Liganden FasL wird eine durch Caspasen getragene Apoptose eingeleitet [38].

Der Fas-Rezeptor wird auf somatischen Zellen sowie auf aktivierten B- und T-Lymphozyten, Hepatozyten und ovariellen Epithelzellen exprimiert [39]. Die Expression von FasL hingegen ist beschränkt auf aktivierte T-Zellen, NK-Zellen sowie den Sertoli-Zellen des Hodens und dem Kornealepithel der Retina [39]. Naive T-Zellen exprimieren FasL nur in sehr geringem Maße [39]. T-Zellen, die jedoch zuvor bereits einmal über den TCR-Rezeptor aktiviert wurden, exprimieren bei einer erneuten Aktivierung eine hohe Anzahl an FasL-Oberflächenmolekülen [39]. Dieser Mechanismus dient zur Regulation des Immunsystems vor überschießenden Reaktionen [39].

Die Zellen des Mammakarzinoms sind ebenfalls in der Lage, FasL in erhöhtem Maße zu exprimieren. Hierdurch sind die Tumorzellen dazu fähig, die Apoptose der T-Lymphozyten zu induzieren und somit die Immunantwort abzuschwächen [40].

Außerdem scheint der Tumor auch einen Einfluss auf die Phänotypen der peripheren Immunzellen zu haben. So zeigten Gruber et al., dass bei Mammakarzinom-Patientinnen die Anzahl der T-Zellen, die den Fas-Rezeptor

exprimieren und somit empfänglich für Apoptose sind, doppelt so groß ist, als bei gesunden Patienten. Hierdurch ist der Tumor in der Lage, das Immunsystem stark zu beeinträchtigen [29].

1.2.6 Die Rolle der Natürlichen Killerzellen

Einen wichtigen Teil der unspezifischen Immunabwehr bildet die Zellgruppe der Natürlichen Killerzellen. Sie sind der Gruppe der Lymphozyten zuzuordnen und entwickeln sich im Knochenmark aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, woraufhin sie im Blut zirkulieren [41].

Durch die fehlende Expression von antigenspezifischen Rezeptoren unterscheiden sie sich jedoch grundlegend von den B- und T-Lymphozyten, die dem spezifischen Immunsystem angehören [42].

Morphologisch erscheinen NK-Zellen mikroskopisch größer und enthalten eine deutlich ausgeprägte zytoplasmatische Granula [41].

Die immunologische Funktion der NK-Zelle beruht auf die in der zytoplasmatischen Granula enthaltenen Effektorproteine [41].

Diese durchdringen, analog zu den im Zuge der Immunantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten freigesetzten Proteine, die Zellmembran der Zielzelle und führen somit zu ihrem Zelltod [41].

NK-Zellen sind vor allem in der frühen Phase der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, beispielsweise Viren, aktiv [41].

Über von Makrophagen nach Antigenkontakt sezernierte Interferone und Zytokine erfolgt die Aktivierung der NK-Zellen, die meist eine Überbrückung der Immunantwort und Eindämmung der Infektion bis zum Ausreifen spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten darstellt [41].

Natürliche Killerzellen sind in der Lage zwischen normalen und infizierten oder malignen Zellen zu unterscheiden [26]. Die Aktivität der NK-Zelle wird über ein Zusammenspiel von aktivierenden und hemmenden Rezeptoren reguliert.

1.2.6.1 Rezeptoren der NK-Zellen

Die Rezeptoren der NK-Zellen können in zwei, in ihrer Funktion gegensätzliche, Rezeptortypen unterteilt werden. Der eine Rezeptortyp wirkt aktivierend auf die NK-Zelle, während der andere Rezeptortyp die Aktivierung hemmt [41].

Eine Aktivierung über die Rezeptoren bewirkt eine Ausschüttung von Zytokinen, sowie eine Freisetzung der zytotoxischen Granula, die schließlich zur Zerstörung der Zielzelle führt [41]. Zusätzlich besitzen NK-Zellen auch Rezeptoren, die für Immunglobuline spezifisch sind und bei Stimulation ebenfalls eine Freisetzung der zytotoxischen Granula im Sinne einer antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) bewirken [41].

Zu den die Aktivität der NK-Zelle bestimmenden Rezeptoren zählen zum einen Mitglieder der Gruppe der Immunglobulin-ähnlichen Proteine (Killerzellen-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren =KIR), als auch der Familie der C-Typ-Lektin Proteine (Killerzellen-Lektin-ähnliche Rezeptoren = KLR) [41].

Jeweils zwei C-Typ-Lektine bilden mit CD94 und einem Protein der NKG2-Familie einen funktionellen Rezeptorkomplex, welcher mit MHC-Molekülen interagiert [41]. Beim Menschen sind die Proteine NKG2A, -B, -C, -D, -E und -F bekannt. Hierbei wirken die Rezeptorkomplexe mit NKG2A und -B inhibitorisch [41]. Der NKG2A-Rezeptor erkennt hierbei körpereigene MHC-I-Moleküle und kann somit eine Immunreaktion gegen gesunde körpereigene Zellen verhindern [26]. NKG2C und -D wirken hingegen aktivierend. NKG2D nimmt hierbei eine gesonderte Rolle ein, da es anders als die anderen NKG2-Komplexe nicht mit MHC-I-Molekülen, sondern mit spezifischen Liganden interagiert [41].

Die MHC-I-ähnlichen Liganden MICA und MICB, sowie Proteine aus der ULBP Familie werden vermehrt auf malignen, virusinfizierten oder sich in Zellstress befindlichen Zellen exprimiert und können vom NKG2D-Rezeptor erkannt werden [43]. Besonders MICA wird vermehrt von epithelialen Tumorzellen exprimiert [43].

Naive NK-Zellen müssen, um aktiviert zu werden, zusätzlich zur NKG2D Aktivierung über den Nkp46-Rezeptor stimuliert werden [25].

Bei reifen NK-Zellen genügt die Aktivierung über NKG2D. Durch Bindung des Liganden an den Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die mit der Phosphorylierung des Dap10 Proteins beginnt und über die Aktivierung der PI3-Kinase und anderen Signalmolekülen zu einer Ausschüttung von Zytokinen und zytotoxischer Granula der NK-Zellen führt [25].

NKG2D wird nicht nur von NK-Zellen exprimiert, sondern kann auch auf CD8+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden [25]. Über den Signalweg der ebenfalls NKG2D exprimierenden T-Lymphozyten wird derzeit noch diskutiert. Man geht jedoch von einem kostimulierenden Signal des NKG2D-Rezeptors aus, nachdem der T-Lymphozyt zuvor über den TCR-Rezeptor aktiviert wurde [25]. Die alleinige Stimulierung über den NKG2D-Rezeptor reicht bei den T-Lymphozyten nicht aus, um sie zu aktivieren [25].

Diese Theorie wird von dem Fakt gestützt, dass während der für die T-Lymphozyten essentiellen Kostimulation über CD28 ebenfalls der Signalweg über die Aktivierung der PI3-Kinase eingeleitet wird, wie es bei dem NKG2D-Signalweg der Fall ist [44].

Die Rezeptoren der KIR-Familie können anhand der Länge ihres zytoplasmatischen Anteils ebenfalls in inhibitorisch und aktivierend wirkende Rezeptoren unterteilt werden. Hierbei wirken Rezeptoren mit einem langen zytoplasmatischen Anteil inhibierend, Rezeptoren mit kurzem zytoplasmatischen Anteil aktivierend [41].

Der Wirkmechanismus der inhibitorisch wirksamen Rezeptoren beruht auf ihre Stimulation durch verschiedene MHC-I-Moleküle, wodurch hierauf die Signalkaskade der aktivierenden Rezeptoren blockiert und somit eine Aktivierung der NK-Zelle verhindert wird [41].

Die Expression von MHC-I-Molekülen schützt die Zelle somit vor dem Angriff der NK-Zellen.

Somit ist das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen maßgeblich für die Interaktion der NK-Zelle mit der jeweiligen Zelle.

Hierzu bestehen zwei mögliche Interaktionsmechanismen.

Die erste Möglichkeit besteht in der Theorie, dass es im Zuge einer Virusinfektion oder Entartung einer Zelle zu einer Verhinderung der

MHC-I-Expression oder einer Veränderung des MHC-I-Moleküls kommt. Hierdurch wird zwar die Erkennung der Zielzelle über zytotoxische T-Lymphozyten verhindert, das inhibitorische Signal der NK-Zellen fällt jedoch hierdurch weg und würde letztendlich zu einer Aktivierung der NK-Zelle und somit Zerstörung der Zielzelle führen [41].

Eine weitere Hypothese könnte die unterschiedliche Reaktion von infizierten und nicht infizierten Zellen auf die, im Zuge der Immunreaktion ausgeschütteten, Interferone α und β darstellen [41]. Während normale, nicht veränderte oder nicht infizierte Zellen, auf die Interaktion mit Interferonen mit einer Erhöhung der MHC-I-Expression reagieren, sind infizierte Zellen nicht in der Lage, die Expression zu erhöhen. Somit fällt bei Ihnen das inhibitorische Signal geringer aus und sie sind schließlich durch NK-Zellen angreifbar [41].

Weiterhin besitzen NK-Zellen aktivierende Rezeptoren, die infizierte Zellen unabhängig der MHC-I-Ausprägung, direkt über spezifische Liganden erkennen. Diese Rezeptoren werden den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) zugeordnet.

Die bekanntesten hierbei sind vor allem Nkp30 und Nkp46 [41]. Deren Aktivierung erfolgt durch spezifische Antigene. Diese sind beispielsweise auf malignen Zellen oder Zellen, die oxidativem Stress oder einer Virusinfektion ausgesetzt sind, vorzufinden [26].

Nkp30 wird durch die beiden Liganden B7H6 und BAG6, die auf malignen Zellen exprimiert werden, aktiviert. Nkp46 hingegen wird durch das Hämagglutinin-Antigen, das von virusinfizierten Zellen exprimiert wird, aktiviert. Welche Liganden bei malignen Zellen zur Aktivierung des Nkp46 Rezeptors führen, ist jedoch noch nicht bekannt [26].

Tumorzellen haben jedoch Wege entwickelt, die Immunabwehr durch die NK-Zellen und T-Lymphozyten zu umgehen.

So sind sie in der Lage unter anderem TGF- β 1, PGE2 und nicht zellgebundenes MICA auszuschütten, die zu einer Downregulation der aktivierenden Rezeptoren führen [26].

Mamessier et al. zeigten, dass sich nach 48-stündiger Inkubation von phänotypisch normalen peripheren NK-Zellen mit Brustkrebszellen die

Phänotypen der NK-Zellen veränderten und der NKG2D-Rezeptor, sowie der Nkp30-Rezeptor, vermindert exprimiert wurden [26].

Es wird angenommen, dass der direkte oder indirekte Kontakt von NK-Zellen mit Tumorzellen über von den Tumorzellen sezernierte, nicht zellgebundenen Signalstoffe, zu einer Internalisierung der aktivierenden Rezeptoren führt [26]. Daraus resultiert eine verminderte oder ein Ausbleiben der Immunreaktion gegen die Tumorzellen [26].

Durch die von den Tumorzellen erfolgte Sezernierung des nicht zellgebundenen MICA erfolgt zudem eine erhöhte Proliferation von NKG2D positiven CD4+/CD25+ T-Regulator-Lymphozyten [25].

Hierin liegt ein weiterer Mechanismus der Tumorzellen, sich der Immunabwehr zu entziehen. T-Regulator-Lymphozyten bewirken eine Immunsuppression, die es dem Tumor ermöglicht, die Immunabwehr zu umgehen [45].

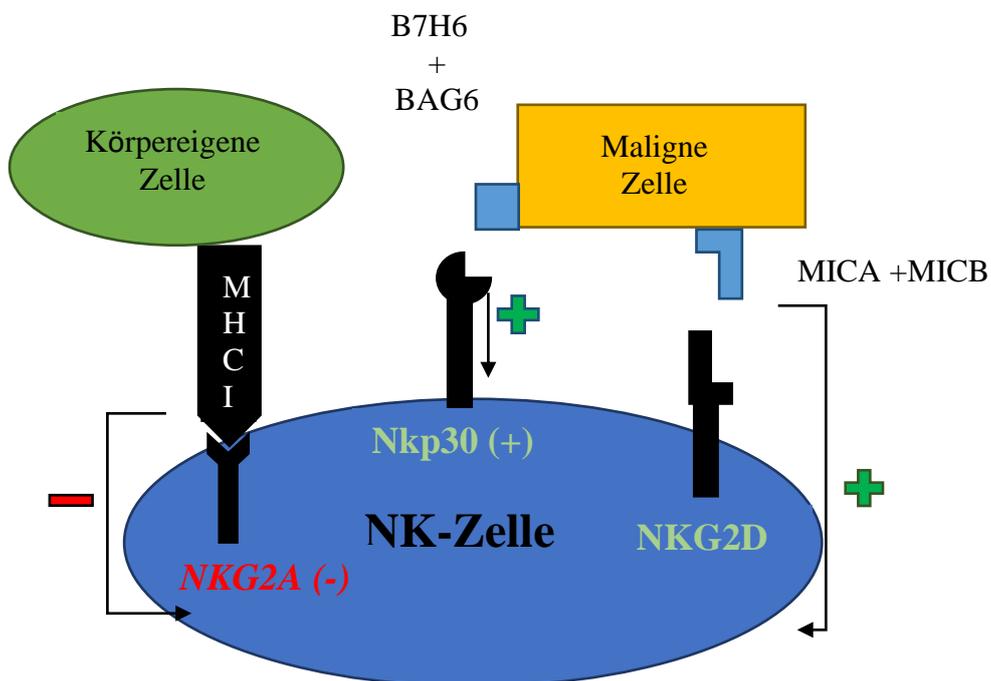


Abbildung 2: Aktivierung und Hemmung der NK-Zellen

1.3 Fragestellung

Nach dem von F.N. Burnet 1957 beschriebenen Prinzip der Immunüberwachung lösen im Regelfall Tumor-spezifische Antigene eine Immunantwort aus, wodurch ein intaktes Immunsystem in der Lage ist, die Entstehung des Tumors zu verhindern [46].

Voranschreitende Mutationen der Tumorzellen sowie tumorinduzierte Veränderungen der Immunzellen, sind Mechanismen, die zu einer Einschränkung und Störung der Immunüberwachung führen können.

So konnte bereits gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom eine verminderte Expression von CD28, sowie eine erhöhte Apoptoseanfälligkeit der T-Lymphozyten vorlag [29]. Zudem konnte auch bereits nachgewiesen werden, dass sich NK-Zellen nach Inkubation mit Tumorzellen phänotypisch in ihrer Rezeptorexpression veränderten [26].

Die Zellen, die nach dem heutigen Kenntnisstand der Immunüberwachung als erstes mit Tumorzellen in Kontakt treten, sind die NK-Zellen [47].

Eine verminderte NK-Zellaktivität wird in verschiedenen Studien mit einem gehäuften Auftreten von malignen Erkrankungen assoziiert [48, 49].

Eine besonders aggressive Art des Mammakarzinoms stellt der Triple-negative Tumor dar. Dieser wird durch eine fehlende Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie von HER2/neu charakterisiert [15].

Bei diesem Tumor liegt in den meisten Fällen ein G3 Grading vor [15].

Daher soll im Zuge dieser Arbeit untersucht werden, ob das Grading des Primärtumors Einfluss auf die Immunzellen, speziell auf die NK-Zellen, die als erste Effektorzellen mit dem Tumor in Kontakt treten, ausübt.

Hierbei soll zwischen den Immunzellen des peripheren Immunsystems und des Immunsystems im Knochenmark unterschieden werden.

Ferner sollen die phänotypischen Veränderungen der Immunzellen des peripheren Immunsystems und des Immunsystems im Knochenmark im Zuge des bei G3 Tumoren häufiger auftretenden [50] Vorliegens von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv wurde prospektiv im Zeitraum zwischen September 2014 und September 2015 erhoben.

Hierbei handelte es sich um Patientinnen mit primärem invasivem Mammakarzinom, die an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen operativ therapiert wurden und bei denen ebenfalls eine Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen des Blutes oder des Knochenmarks durchgeführt wurde.

In das Patientenkollektiv eingeschlossen wurden ausschließlich Patientinnen, die primär operativ therapiert wurden, bei denen es sich nicht um ein Rezidiv handelte und bei denen keine vorherige Krebserkrankung oder Immuntherapie vorlag.

Hieraus ergab sich ein Patientenkollektiv von insgesamt 97 Patientinnen.

Hiervon wurde bei 92 Patientinnen eine Untersuchung der Lymphozytensubpopulation im Blut und bei 75 Patientinnen im Knochenmark durchgeführt. Die im Rahmen des operativen Eingriffs erfolgte routinemäßige Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm wurde zur Untersuchung auf disseminierte Tumorzellen und, nicht bei allen Patientinnen, zur Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen im Knochenmark verwendet.

Zur Untersuchung der Lymphozytensubpopulation im Blut und zur Untersuchung des Vorhandenseins von zirkulierenden Tumorzellen im Blut erfolgte bei den Patientinnen spätestens ein Tag präoperativ die Abnahme von venösem Blut.

2.1.2 Laborausstattung

Neubauerkammer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SuperFrost®Plus-Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Filterkarten	Hettich, Tuttlingen
10 ml sterile, RNase-freie Plastikpipette	Costar, USA
1,5 ml sterile, RNase-freie	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	
50 ml Falcon®-Polypropylen-Röhrchen	Falcon, USA
15 ml Zentrifugenröhrchen	Falcon, USA
Pipette (100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipette (1,0 – 200,0 µl) Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
0,5 – 10 µl Natural Pipette Tips	Starlab, Ahrensburg
101 – 1000 µl Natural Pipette Tips	Starlab, Finnland
0,2 ml sterile, RNase-freie PCR-Gefäß	Starlab, Ahrensburg
CryoTube™-Röhrchen	Nunc®, USA
CellSave Preservative Tubes	Veridex LLC, USA
10 µl Zwölfkanalpipette Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Multititerplatte 96DeepWell PP Plate Natural	Nalge Nunc International, USA
BD Falcon™ (FACS-Röhrchen)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Geräte

Überkopfmischer Sample Mix MXIC 1	Dynal, Norwegen
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus, Osterode
Zytozentrifuge Rotina 380	Hettich, Tuttlingen
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Osterode
Dako Autostainer	Dako GmbH, Hamburg
CellTracks® AutoPrep® System	Janssen Pharmaceutical Companies, USA
CellTracks Analyzer II®	Janssen Pharmaceutical Companies, USA
Sysmex XP-300	Sysmex GmbH, Norderstedt
Vortexer	Cenco Instrumenten BV., Niederlande
FACSCalibur™ (Durchflusszytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.4 Software

FACSCComp™ Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Software Cell Quest Pro®	Becton Dickinson, Heidelberg
SPSS Statistics	IBM, Version 23

2.1.5 Chemiekalien

Ampuwa (deionisiertes Wasser)	Fresenius AG, Bad Homburg
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom KG, Berlin
Ficoll-Hypaque®	Biochrom KG, Berlin
Trypanblau-Lösung	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Formalin-Lösung (0,5%)	Merck KgaA, Darmstadt
Vector Red Substrate Kit (magenta)	Vector Laboratories, USA
Histoprime Puffer für Histo Red-AP Substrate Kit	Linaris GmbH, Dossenheim
Mouse IgG1 A45B/B3 Anti Human CK	Micromet AG, München
ImmPRESS™-AP anti-mouse IG Reagenz	Vector Laboratories, USA

Pferdeblut-Serum 2,5%	Vector Laboratories, USA
M30 CytoDeath	Roche Life Sciences, Penzberg
Anti c-erbB-2(Her-2/neu)	Biogenex, USA
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako GmbH, Hamburg
Dako REAL™ Hämatoxylin	Dako GmbH, Hamburg
CellSearch® Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial)	Veridex LLC, USA
Anti-EpCAM Ferrofluid	
Farbreagenz	
Nukleinsäure-Färbung	
Capture-Enhancement-Reagenz	
Permeabilisierungsreagenz	
Zellfixiermittel	
Verdünnungspuffer	
CellTracks® AutoPrep® Instrument	Veridex LLC, USA
Buffer	
CellSearch® Circulating Tumor Cell Control Kit	Veridex LLC, USA
FACS-Lyselösung	Becton Dickinson, Heidelberg
CellWASH™	Becton Dickinson, Heidelberg
Digitonin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BD CellFIX™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSClean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACSTFlow™	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Calibrite™ Beads	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.6 Antikörper

Mouse IgG1k Alexa Fluor 647	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG1k PE-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG1k PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG2a FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4 APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8 APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD28 PE	BioLegend, Kanada
CD19 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
Quantibrite™ CD38 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD95 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD127 Alexa Fluor 647	
NKG2D APC	Becton Dickinson, Heidelberg
Nkp46 PE-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
CD337 (Nkp30) Alexa Fluor 647	Becton Dickinson, Heidelberg
Simultest CD3/16+56+ FITC PE	Becton Dickinson, Heidelberg
TCR-zeta FITC	Biozol, Eching

2.2 Methoden

2.2.1 Detektion der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Zusammengefasst erfolgt die Detektion der disseminierten Zellen im Knochenmark zunächst durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation des Knochenmarks. Daran schließt sich die Anfertigung von Zytospins an, woraufhin anschließend die Markierung der Tumorzellen durch einen gegen Zytokeratin gerichteten Antikörper erfolgt.

Zur Dichtegradzentrifugation des heparinisierten Knochenmarks werden 15 bis 20 ml des Knochenmarks in ein 50 ml Falcon®-Polypropylen-Röhrchen überführt und unter Zugabe von 30 ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (engl. phosphatebuffered saline = PBS) verdünnt. Parallel hierzu wird ein weiteres 50 ml Falcon®- Polypropylen- Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Hypaque®, einem Separiermedium, aufgefüllt und anschließend das verdünnte Knochenmark hinzugegeben. Daraufhin erfolgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 1600 rpm, wobei die verschiedenen Knochenmarksbestandteile in unterschiedliche Phasen aufgeteilt werden. Hierbei enthält die Interphase die mononukleäre Fraktion, welche sich aus den Lymphozyten und Monozyten zusammensetzt.

Diese wird in ein weiteres Falcon®-Propylen- Röhrchen abpipettiert und mit 30 ml PBS resuspendiert.

Es folgt ein Waschvorgang durch erneute Zentrifugation (7 min, 1600 rpm) und Entfernung des Überstandes. Um eventuell noch verbliebene Erythrozyten zu zerstören, werden, je nach Pelletgröße, 10-20 ml Lysepuffer (1,0 g KHCO_3 , 8,3 g NH_4Cl , 0,037 g EDTA und 800 ml Aqua dest., unter Zugabe von KOH den pH-Wert auf 7,5 einstellen und anschließend auf 1 l verdünnen) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 4°C im Kühlschrank belassen. Nach dieser Inkubationszeit wird nochmals zentrifugiert (7 min, 1600 rpm) und der Überstand abpipettiert. Das verbliebene Sediment wird anschließend mit 10 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden 50 µl dieser Knochenmarksuspension mit Trypanblau-Lösung gefärbt, um daraufhin in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop die Anzahl der mononukleären Zellen zu bestimmen.

Anschließend wird ein weiteres Mal zentrifugiert (7 min, 1600 rpm) und der Überstand abgekippt, und, mit Hilfe der nun bekannten Anzahl der monokleären Zellen, eine mit PBS verdünnte Knochenmarkssuspension mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml hergestellt.

Diese Suspension wird zur zytologischen Differenzierung der in der Suspension enthaltenen Zellen mittels Zytospin genutzt.

Hierzu wird 1 ml der Knochenmarkssuspension auf acht positiv geladenen SuperFrost®Plus- Objektträger vorgelegt.

Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 2500 rpm erfolgt eine weitere Zentrifugation (1 min, 2500 rpm). Es folgt eine 12-24-stündige Trocknung bei Raumtemperatur und eine daran anschließende Fixation mit 0,5%-iger Formalin-Lösung zur Einleitung einer immunhistochemischen Untersuchung.

Die Tatsache, dass epitheliale Zellen Zytokeratine exprimieren können, normale Zellen des Knochenmarks jedoch nicht dazu fähig sind, ermöglicht die Detektion der epithelialen Tumorzellen an Hand von Antikörpern, die gegen Zytokeratine gerichtet sind. Hierzu wird der Antikörper A45/B3 eingesetzt, der sich gegen die Zytokeratine CK8, CK18 und CK 19 richtet. Die Färbung wird automatisiert mittels ImPRESS™-AP Anti-Mouse IG Reagenz im Dako Autostainer durchgeführt. Hierbei erfolgt nach Protein-Blockade durch ein 2,5%-iges Pferdeblut-Serum (horse serum) die Markierung der Tumorzelle durch den Primärantikörper.

Nach 30-minütiger Inkubation erfolgt die Zugabe des Enzymimmunkomplexes aus Alkalischer Phosphatase. Nach Zugabe des Substrats Neofuchsin wird dieser Komplex über eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht und daraufhin eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt.

Hieraus resultiert, bei Betrachtung unter dem Mikroskop, die Rotfärbung der Tumorzellen und die Blaufärbung der normalen Knochenmarkszellen.

Die Tumorzellen wurden nicht nur ausschließlich durch ihre Färbung identifiziert, sondern auch durch ihre charakteristische Morphologie, die durch eine zum Kern verschobene Zell-Plasmaverteilung, eine unregelmäßige Chromatinstruktur und einer Zunahme der Zellgröße gekennzeichnet ist.

Zudem treten Tumorzellen meist in Zellverbänden, sogenannten Clustern, auf.

2.2.2 Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut

Um Tumorzellen im Blut nachzuweisen wurde das Verfahren *CellSearch*[®] durchgeführt.

Mit dem *CellSearch*[®] Circulating Tumor Cell Kit wird die Anzahl der im Blut zirkulierenden Tumorzellen mit epithelialeem Ursprung, die das Oberflächenmolekül-Expressionsmuster CD45-, EpCAM+, CK8+, CK18+ und/oder CK19+ aufweisen, bestimmt.

Hierzu werden die Tumorzellen mit Hilfe von EpCAM-Antikörpern angereichert und anschließend, nach Färbung mit Fluoreszenz, unter Zuhilfenahme eines halbautomatischen Fluoreszenzmikroskopes gezählt und analysiert.

Zu Beginn werden ca. 9 ml Blut in ein *CellSave Preservative Tube* abgenommen. 7,5 ml dieses Blutes werden in ein konisches 15 ml Röhrchen überführt und mit 6,5 ml Verdünnungspuffer überschichtet. Nach 10-minütiger Zentrifugation wird der Inhalt in das *CellTracks*[®] *AutoPrep*[®] System überführt.

Hierbei handelt es sich um ein automatisiertes System, bei welchem folgende Schritte ablaufen: Der Probe werden Anti-EpCAM Ferrofluid und Caprine-Enhancement-Reagenz hinzugefügt. Nach immunomagnetischer Separation wird der Überstand, der die ungebundenen Zellen und überschüssiges Plasma enthält, entfernt. Die übrig gebliebenen, an Ferrofluid gebundenen Zellen, werden in Pufferlösung resuspendiert. Da jedoch die gesuchten Zytokeratine intrazellulär anzutreffen sind, erfolgt darauffolgend eine Behandlung der Zellen mit einem Permeabilisierungsreagenz. Anschließend kann nun die Markierung mit den folgenden Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern erfolgen:

Der Fluoreszenzfarbstoff Anti-CK-Phykoerythrin ist spezifisch für intrazelluläre Zytokeratine, 6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid ist spezifisch für die Nukleinsäuren im Zellkern, während Anti-CD45-Allophycocyanin spezifisch für Leukozyten ist und dadurch die Unterscheidung dieser von epithelialen Zellen ermöglicht.

Nach magnetischer Separation der gebundenen Zellen und Entfernen der ungebundenen Fluoreszenzreagenzien werden die Zellen fixiert.

Hierbei werden die gebundenen Zellen so lange angereichert und konzentriert, bis die Blutmenge anstatt der ursprünglichen 7,5 ml auf 300 µl reduziert wird.

Diese 300 µl werden automatisch in eine Kartusche der MagNest - Einheit überführt. Hier erfolgt bei Raumtemperatur innerhalb von mindestens 20 Minuten bis maximal 24 Stunden eine Anreicherung und Ausrichtung der immunomagnetisch markierten Zelle an der magnetisierten Oberfläche der Kartusche. Anschließend erfolgt die Analyse dieser Zellen im CellTracks AnalyzerII®. Hierbei handelt es sich um ein halbautomatisches Fluoreszenzmikroskop, welches die Oberfläche jeder Kartusche vier Mal scannt, wobei bei jedem Scan ein anderer Fluoreszenzfilter eingesetzt wird. Die vier Bilder werden digital übereinandergelegt, woraus sich für jede Zelle ein spezifisches Muster ergibt. Hieraus werden die Zellen mit einem epithelialen Fluoreszenzmuster (Zytokeratin-positiv, Nukleinsäure-positiv, CD45-negativ) selektiert und auch ebenfalls an Hand der für epitheliale Zellen charakteristischen Morphologie, wie beispielsweise einem deutlich abgrenzbaren Zellkern, oder Zellgrößen ab 4 µm, selektiert und ausgewertet. Der Test wird als positiv gewertet sobald mehr als 5 CTC/7,5 ml Blut gezählt werden.

Parallel wird nochmals eine Kontrolle mit Hilfe des CellSearch® Circulating Tumorcell-Control Kit vollzogen.

2.2.3 Analyse der Lymphozytensubpopulationen in Blut und Knochenmark mittels Durchflusszytometrie

2.2.3.1 Funktionsprinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Zellen ihrer jeweiligen Subpopulation zuzuordnen, indem Größe und Granularität der jeweiligen Zellen bestimmt und verglichen werden.

Das Durchflusszytometer (engl. fluorescence activated cell sorter = FACS) besteht aus einer optischen Komponente, welche sich aus Laser, Filter, Spiegel und Photodektoren zusammensetzt, sowie einer hydrodynamischen Komponente, die dafür verantwortlich ist, dass die Zellen in einer Trägerflüssigkeit einzeln in laminärer Strömung an dem Laserstrahl der

optischen Komponente vorbeigeleitet werden [51]. Trifft der Laserstrahl der optischen Komponente auf eine Zelle, so wird dieser Strahl abgelenkt.

Hierbei wird zwischen einem Vorwärtsstreulicht (engl. Forwardscatter, FSC, 3-10° Ablenkung) und einem Seitwärtsstreulicht (engl. Sidescatter, SSC, ca. 90° Ablenkung) unterschieden [51].

Das Vorwärtsstreulicht ist charakteristisch für die Größe der Zelle, da es vorwiegend durch die Beugung an der Zelloberfläche entsteht [51].

Das Seitwärtsstreulicht hingegen entsteht durch Brechung oder Reflexion an intrazellulären Komponenten und gibt somit Auskunft über die Zellgranularität der Zelle [51].

Die weiteren Komponenten des optischen Systems leiten das gestreute Licht weiter zu Photodetektoren. Hier erfolgt die Umwandlung des optischen Signals in ein elektrisches Signal. Dieses Signal wird wiederum digitalisiert und kann somit am Computer analysiert werden [51].

2.2.3.2 Antikörpermarkierung

Zur Analyse von intra- und extrazellulären Zellmerkmalen werden fluoreszenzgekoppelte Antikörper verwendet. Nach Bindung des Antikörpers an das Antigen wird der an ihm gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff zur Emission von Licht im Fluoreszenzbereich angeregt. Hierbei ist die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Antigenmenge der untersuchten Zelle.

In dieser Analyse wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Peridinin-Chloophyllprotein (PerCP), Phycoerythrin-Cyanine (PE-Cy7) und Alexa Fluor 647 verwendet.

Zur Abdeckung der verschiedenen Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe werden ein Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) welcher FITC, PE, PerCP und PE-Cy7 anregt, sowie ein Diodenlaser ($\lambda = 635 \text{ nm}$) zur Anregung von APC und Alexa Fluor 647 verwendet.

2.2.3.3 Probenvorbereitung

Zur FACS- Analyse der Proben erfolgt zunächst aus den präoperativ gewonnenen Blutproben und den Knochenmarksproben mit Hilfe des vollautomatischen Hämatology-Analysator Sysmex XP-300 eine Anfertigung eines Differentialblutbildes mit der absoluten Anzahl der Leukozyten sowie dem prozentualen Anteil der Lymphozyten.

Daraufhin werden je 100 µl Blut bzw. Knochenmark in 11 FACS-Tubes pipettiert. Zu den Proben werden verschiedene, für Lymphozytensubpopulationen spezifische und Fluoreszenz-gekoppelte, Antikörper hinzugegeben.

Zur Lyse, der sich noch in den Proben befindlichen Erythrozyten, werden nach 15-minütiger Inkubation 750 µl FACS-Lyselösung hinzugefügt. Daraufhin werden die Proben weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der darauffolgenden 5-minütigen Zentrifugation bleiben die Leukozyten als Sediment zurück, das Erythrozytenlysat bildet den Überstand der daraufhin verworfen wird. Der darauffolgende Schritt besteht darin, aus den Tubes 1-8 die ungebundenen Antikörper unter Hinzufügen von je 500 µl CellWASH™, auszuwaschen. Die Tubes 9, 10 und 11 werden zum Nachweis intrazellulärer Antigene verwendet und werden hierfür durch Zugabe von jeweils 500 µl kalter (+4°C) Digitonin-Lösung als Permeabilisator behandelt. Nach dem Auswaschen der Digitonin-Lösung werden die für intrazelluläre Antigene spezifischen Antikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde werden die Proben zentrifugiert (5 min, 250 x g) und der Überstand verworfen. Es folgen zwei Waschvorgänge unter Hinzufügen von 500 µl CellWASH™ und eine erneute Zentrifugation (5 min, 250 x g) und Entfernung des Überstandes.

Die in den Kammern verbliebenen Zellen werden mit Fixierlösung resuspendiert und bis zum weiteren Vorgehen bei 4°C gelagert.

2.2.3.4 Probenanalyse

Zur Analyse wird der Inhalt jeder Kammer in ein FACS-Röhrchen (BD-Falcon™) überführt und im Durchflusszytometer FACS-Calibur™ analysiert.

Anhand der Werte der Antikörper-Isotypenkontrollen in den Tubes 1, 7, und 9 wird die Einstellung des Durchflusszytometers geprüft und, bei Überschneidung der Emissionsspektren zweier Fluoreszenzfarbstoffe, manuell nachjustiert.

Um den Zelldebris aus der Datenaufnahme auszuschließen kann auch die FSC- (Forwardscatter-) Schwelle manuell modifiziert werden.

Pro Probe werden mindestens 20000 Zellen zur Analyse herangezogen.

2.2.3.5 Datenanalyse

Mittels der Software FACSComp™ und Cell Quest Pro® ist es nicht nur möglich zwischen den unterschiedlichen Leukozytenpopulationen zu differenzieren, sondern auch die intra- und extrazellulären Zellmerkmale durch Fluoreszenzgekoppelte Antikörper zu analysieren.

Das Computerprogramm stellt die Ergebnisse als Punktwolken dar, wobei jeder Punkt ein Ereignis darstellt. Hierzu werden jeweils zwei Werte gegeneinander aufgetragen (FSC, SSC oder Fluoreszenzintensität).

Da Zellgröße und Zellgranularität für die jeweilige Leukozytensubpopulation spezifisch sind, kann durch Gegenüberstellung von FSC (charakteristisch für Zellgröße) und SSC (charakteristisch für Zellgranularität) die jeweilige Leukozytenpopulation bestimmt werden [51] (siehe Abbildung 3).

Im Computerprogramm ist ein sogenanntes "Gating" möglich.

Hierbei wird die Analyse und Darstellung auf eine bestimmte Leukozytensubpopulation beschränkt, in dem die geeigneten und für diese Subpopulation spezifischen FSC/SSC Wertepaare ausgewählt werden.

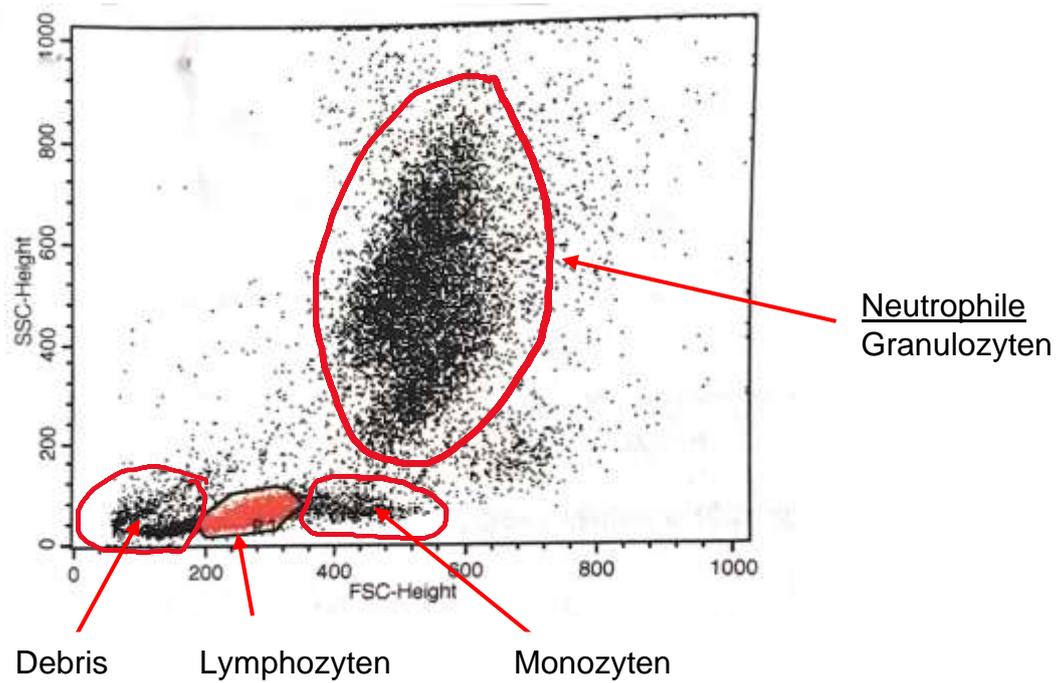


Abbildung 3: Punktwolkendarstellung unter Gegenüberstellung von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen

In Abbildung 4 wurde das erste Gate (R1) auf die Lymphozytensubpopulation gesetzt.

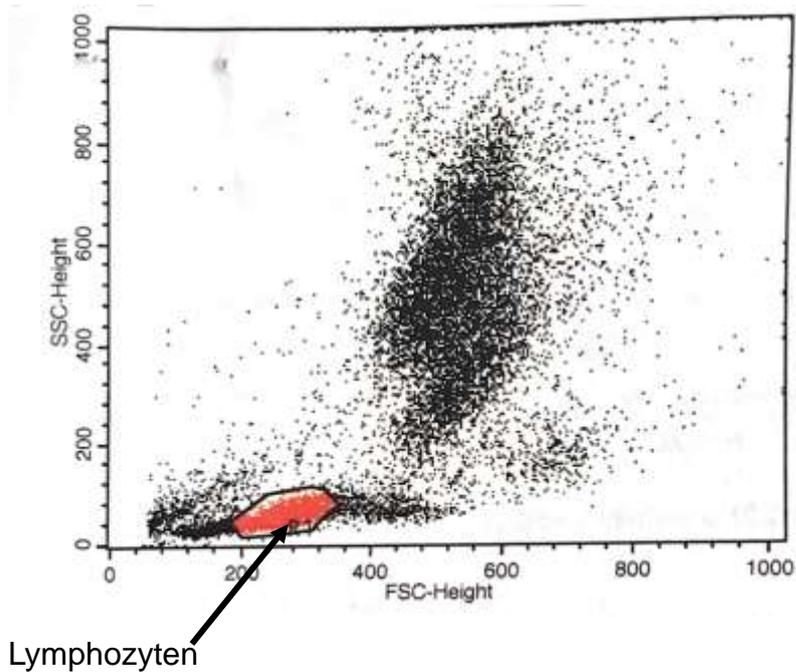
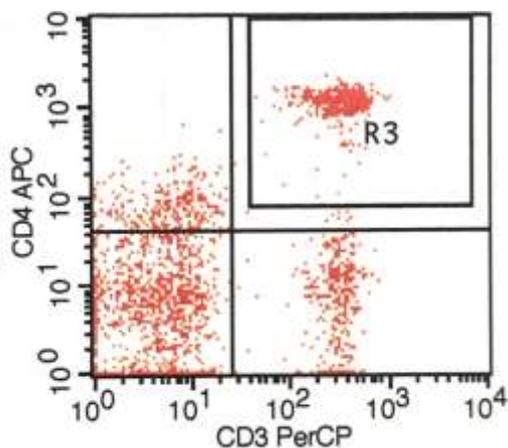


Abbildung 4: Gating der Lymphozytensubpopulation

Die gatedete Subpopulation wird in einer über zwei Parameter aufgetragene Punktwolkendarstellung dargestellt, welche durch die sogenannten Quadrant-Statistikmarker in vier Quadranten eingeteilt wird. Punkte, die sich im oberen, rechten Quadranten befinden (UR) sind für beide Parameter positiv, während Punkte im unteren linken Quadranten (LL) für beide Parameter negativ sind. Punkte im oberen linken (UL) und im unteren rechten (LR) sind nur für jeweils einen der Parameter positiv.

Für jeden Quadranten wird aus der Anzahl der Ereignisse innerhalb des Quadranten geteilt durch die Gesamtzahl der Ereignisse der prozentuale Anteil an den Gesamtereignissen (% Gated) berechnet. So kann beispielsweise bei Wahl des Gates der Lymphozyten durch gegeneinander Auftragen der Parameter CD3 und CD4 im UR Quadranten der prozentuale Anteil von gleichzeitig CD3- und CD4-positiven Zellen (welche den T-Helfer-Lymphozyten entsprechen) bestimmt werden (s. Abbildung 5).



Das Gate (R3) befindet sich im UR-Quadrant und ist somit um die gleichzeitig CD3- und CD4-positiven Lymphozyten gesetzt (entsprechend den T-Helfer-Lymphozyten).

Abbildung 5: Punktwolkendarstellung im Lymphozytengate mit Quadrantstatistikmarker bei Gegenüberstellung von CD3 und CD4

Anhand der Quadrantstatistik (Abbildung 6) kann der prozentuale Anteil der T-Helfer-Lymphozyten in der zuvor gegateten Lymphozytenpopulation (Abbildung 5) eingesehen werden.

Die für Abbildung 5 erstellte Quadrantstatistik (Abbildung 6) zeigt einen prozentualen Anteil von 22,15% T-Helfer-Lymphozyten.

Tube: tube #10
 Gate: Lymphos
 Gated Events: 2262
 Total Events: 20660
 X Parameter: CD3 PerCP (Log)
 Y Parameter: CD4 APC (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	307	13.57	1.49
UR	501	22.15	2.42
LL	1101	48.67	5.33
LR	353	15.61	1.71

Abbildung 6: Quadrantstatistik

2.2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Statistics 24.

Anhand der im Differentialblutbild ermittelten Werte der absoluten Anzahl der Leukozyten und dem Wert des prozentualen Anteils der Lymphozyten, konnte die absolute Anzahl der Lymphozyten berechnet werden.

Mit den aus der FACS-Analyse bestimmten prozentualen Anteilen der jeweiligen Lymphozytensubpopulationen konnte somit die absolute Anzahl der Lymphozyten in der jeweiligen Subpopulation berechnet und statistisch miteinander verglichen werden. Hierbei wurden die Mittelwerte und Standardabweichung der jeweiligen Subpopulation berechnet und unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für nichtparametrische unabhängige Stichproben auf signifikante Unterschiede und Zusammenhänge untersucht.

Zur Überprüfung eines Zusammenhangs der klinisch-pathologischen Charakteristika der Patientinnen, zum einen, mit dem vorliegenden Grading und, zum anderen, mit dem Vorliegen von disseminierten Zellen, wurde der exakte Test nach Fisher durchgeführt und die zweiseitige Signifikanz ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische und pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv setzt sich aus Patientinnen zusammen, die an einem primären invasiven Mammakarzinom erkrankt und im Zeitraum zwischen September 2014 und September 2015 an der Universitätsfrauenklinik Tübingen primär operativ behandelt wurden und bei denen ebenfalls eine Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen im Knochenmark oder im Blut erfolgte.

Das Patientenkollektiv umfasst insgesamt 97 Patientinnen.

Die klinischen und pathologischen Charakteristika für die 97 Patientinnen des Gesamtkollektivs wurden tabellarisch erfasst und sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei 92 dieser Patientinnen konnte eine quantitative Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen im Blut durchgeführt werden. Bei 75 Patientinnen des Gesamtkollektivs wurde eine quantitative Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen im Knochenmark durchgeführt.

Hierbei ist das Vorliegen eines T1 Tumors bei mehr als der Hälfte der Patientinnen zu vermerken (56%).

Zudem lag bei den meisten Patientinnen (73%) kein Lymphknotenbefall vor.

Der Hormonrezeptorstatus erwies sich mehrheitlich als Östrogen- und Progesteron-positiv (ER+: 86%, PR+:69%), während die HER2/neu-Expression bei 92% der Patientinnen negativ ausfiel.

Bei mehr als der Hälfte der Patientinnen im Gesamtkollektiv (57%) konnte ein Tumor mit Grading G2 nachgewiesen werden.

Der Ellston-Ellis-Score liegt bei dem Großteil der Patientinnen im Gesamtkollektiv (73%) unter 7 Punkten und spricht daher ebenfalls für das mehrheitliche Vorliegen von gut bis mäßig differenzierten Tumoren.

Die Patientinnen im Gesamtkollektiv sind vorwiegend postmenopausal (69%).

Tabelle 2: Klinische und pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

	Gesamtkollektiv
Gesamt	97
T-Klassifikation	
pT1: Tumorausdehnung ≤ 2cm	54 (56%)
pT2: Tumorausdehnung 2-5 cm	38 (39%)
pT3: Tumorausdehnung ≥ 5 cm	2 (2%)
pT4= Ausdehnung Brustwand oder Haut	3 (3%)
Lymphknotenbefall*	
pN0: kein LK Befall	70 (74%)
pN1: 1-3 LK	16 (17%)
pN2: 4-9 LK	7 (7%)
pN3: > 10 LK	2 (2%)
Grading	
G1	17 (17%)
G2	56 (58%)
G3	24 (25%)
Östrogenrezeptorstatus	
positiv	85 (88%)
negativ	12 (12%)
Progesteronrezeptorstatus	
positiv	69 (71%)
negativ	28 (29%)
HER2/neu	
positiv	8 (8%)
negativ	89 (92%)
Ellston-Ellis-Score	
3-7 Punkte	72 (74%)
8-9 Punkte	25 (26%)
Menopausenstatus*	
prämenopausal	29 (31%)
postmenopausal	65 (69%)
DTC*	
positiv	10 (12%)
negativ	76 (88%)
CTC*	
positiv	6 (7%)
negativ	82 (93%)

* Es lagen für dieses Charakteristikum nicht von allen Patientinnen Daten vor

3.2 Korrelation des Differenzierungsgrades des Tumors mit klinischen und pathologischen Charakteristika sowie mit der Tumorzell dissemination

Bei der Auswertung des gesamten Patientenkollektivs (Tabelle 3) konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Grading des Tumors und dessen Größe, dem Lymphknotenbefall oder dem Menopausenstatus festgestellt werden.

Dahingegen zeigte sich bei G3 Tumoren ein signifikanter Zusammenhang im Bezug zur Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren.

Patientinnen mit einem G3 Tumor exprimierten signifikant weniger Östrogen- und Progesteronrezeptoren als Patientinnen mit einem besser differenzierten Tumor (G1+G2).

Bei der HER2/neu-Expression zeigte sich hingegen keine signifikante Korrelation.

Da die Bestimmung des Grading aus dem histopathologisch ermittelten Ellston-Ellis-Score erfolgt, ist daraus folgend ebenfalls in den vorgelegten Ergebnissen eine signifikante Korrelation des Scores mit dem Grading zu erkennen.

Es zeigte sich, dass Patientinnen mit disseminierten Zellen im Knochenmark zu 40% einen G3 Tumor aufwiesen, während nur bei 22% der Patientinnen, ohne disseminierte Zellen im Knochenmark, ein G3 Tumor vorlag.

Hierbei lag jedoch keine statistische Signifikanz vor.

Tabelle 3: *Klinische und pathologische Charakteristika sowie die Tumorzell dissemination in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades (G1+G2 vs. G3)*

	Gesamtkollektiv	G1 +G2	G3	P-Wert
Gesamt	97	73 (75%)	24 (25%)	
T-Klassifikation				0,06
pT1	54	45 (83%)	9 (17%)	
pT2-4	43	28 (65%)	15 (35%)	
Lymphknotenbefall *				0,17
positiv	25	16 (64%)	9 (36%)	
negativ	70	56 (80%)	14 (20%)	
Östrogenrezeptorstatus				0,001
positiv	85	69 (81%)	16 (19%)	
negativ	12	4 (33%)	8 (67%)	
Progesteronrezeptorstatus				0,001
positiv	69	59 (86%)	10 (14%)	
negativ	28	14 (50%)	14 (50%)	
HER2/neu				0,10
positiv	8	4 (50%)	4 (50%)	
negativ	89	69 (78%)	20 (22%)	
Ellston-Ellis-Score				0,000
3-7 Punkte	72	72 (100%)	0 (0%)	
8-9 Punkte	25	1 (4%)	24 (96%)	
Menopausenstatus *				0,45
prämenopausal	29	20 (69%)	9 (31%)	
postmenopausal	65	50 (77%)	15 (23%)	
DTC*				0,25
positiv	10	6 (60%)	4 (40%)	
negativ	76	59 (78%)	17 (22%)	
CTC*				1,00
positiv	6	5 (83%)	1 (17%)	
negativ	82	61 (74%)	21 (26%)	

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (exakter Test nach Fisher, 2-seitige Signifikanz)

* Es lagen für dieses Charakteristikum nicht von allen Patientinnen Daten vor

3.3 Häufigkeit des Auftretens von disseminierten Tumorzellen im gesamten Patientenkollektiv

Bei 86 Patienten des Gesamtkollektivs (n= 97) wurde eine Untersuchung auf das Vorhandensein von DTCs durchgeführt.

Hierbei konnten bei 12% dieser Patienten (n= 10) DTCs nachgewiesen werden (s. Tabelle 2).

88 Patienten des Gesamtkollektiv (n=97) wurden auf das Vorhandensein von CTC untersucht. Bei 7% dieser Patienten (n=6) konnten CTC diagnostiziert werden.

3.4 Korrelation des Auftretens von DTCs (disseminierten Tumorzellen im Knochenmark) mit klinischen und pathologischen Charakteristika

Bei Patientinnen mit größeren Tumorbefunden (pT2-4) konnten prozentual mehr als doppelt so häufig DTCs nachgewiesen werden, als bei Patientinnen mit pT1 Befunden (19% vs. 6%, s. Tabelle 4).

Patientinnen mit Lymphknotenbefall wiesen prozentual häufiger DTCs auf als Patientinnen ohne Lymphknotenbefall (19% vs. 9%, s. Tabelle 4).

Bei Patientinnen mit wenig differenzierten Tumoren (G3) konnten prozentual häufiger DTCs nachgewiesen werden als bei Patientinnen mit besser differenzierteren Tumoren (G1+G2) (19% vs. 9%, s. Tabelle 4).

Auch wenn keine statistisch signifikanten Korrelationen nachweisbar ist, zeigt sich jedoch eine Tendenz, bei steigender Befundgröße (pT2-4) und geringerem Differenzierungsgrad des Tumors (G3), häufiger DTCs nachweisen zu können (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Klinische und pathologische Charakteristika in Abhängigkeit der Tumorzelldissemination im Knochenmark (DTC negativ vs. DTC positiv)

	Patienten mit vorliegender DTC Untersuchung	DTC neg	DTC pos	P-Wert
Gesamt	86	76 (88%)	10 (12%)	
T-Klassifikation				0,09
pT1	49	46 (94%)	3 (6%)	
pT2-4	37	30 (81%)	7 (19%)	
Lymphknotenbefall *				0,26
positiv	21	17 (81%)	4 (19%)	
negativ	63	57 (91%)	6 (9%)	
Östrogenrezeptorstatus*				0,63
positiv	74	66 (89%)	8 (11%)	
negativ	12	10 (83%)	2 (17%)	
Progesteronrezeptorstatus*				1,00
positiv	60	53 (88%)	7 (12%)	
negativ	26	23 (89%)	3 (11%)	
HER2/neu *				1,00
positiv	7	6 (86%)	1 (14%)	
negativ	79	70 (89%)	9 (11%)	
Ellston-Ellis-Score *				0,27
3-7 Punkte	64	58 (91%)	6 (9%)	
8-9 Punkte	22	18 (82%)	4 (18%)	
Menopausenstatus *				0,16
prämenopausal	25	20 (80%)	5 (20%)	
postmenopausal	59	54 (92%)	5 (8%)	
G_Stadium*				0,25
G1+2	65	59 (91%)	6 (9%)	
G3	21	17 (81%)	4 (19%)	

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (exakter Test nach Fisher, 2-seitige Signifikanz)

* Es lagen für dieses Charakteristikum nicht von allen Patientinnen Daten vor

3.5 Korrelation des Auftretens von CTCs (disseminierte Tumorzellen im Blut) mit klinischen und pathologischen Charakteristika

Zwischen dem Auftreten von CTCs und den klinischen und pathologischen Charakteristika konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Hierbei ist festzuhalten, dass es sich bei der Gruppe der CTC+ Patienten um eine kleine Gruppe handelt (n=6) und daher keine signifikanten Ergebnisse zu erwarten sind.

Tabelle 5: *Klinische und pathologische Charakteristika in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Blut (CTC negativ vs. CTC positiv)*

	Patienten mit vorliegender CTC Untersuchung	CTC neg	CTC pos	P-Wert
Gesamt	88	82 (93%)	6 (7%)	
T-Klassifikation				0,70
pT1	50	46 (92%)	4 (8%)	
pT2-4	38	36 (95%)	2 (5%)	
Lymphknotenbefall *				0,64
positiv	22	20 (91%)	2 (9%)	
negativ	64	60 (94%)	4 (6%)	
Östrogenrezeptorstatus*				0,53
positiv	78	73 (94%)	5 (6%)	
negativ	10	9 (90%)	1 (10%)	
Progesteronrezeptorstatus*				0,18
positiv	65	62 (95%)	3 (5%)	
negativ	23	20 (87%)	3 (13%)	
HER2/neu *				1,00
positiv	6	6 (100%)	0 (0%)	
negativ	82	76 (93%)	6 (7%)	
Ellston-Ellis-Score *				1,00
3-7 Punkte	65	60 (92%)	5 (7%)	
8-9 Punkte	23	22 (96%)	1 (4%)	
Menopausenstatus *				0,17
prämenopausal	26	26 (100%)	0 (0%)	
postmenopausal	59	53 (90%)	6 (10%)	
G_Stadium*				1,00
G1+2	66	61 (92%)	5 (8%)	
G3	22	21 (96%)	1 (4%)	

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (exakter Test nach Fisher, 2-seitige Signifikanz)

* Es lagen für dieses Charakteristikum nicht von allen Patientinnen Daten vor

3.6 Verteilung der Differenzierungsgrade im gesamten Patientenkollektiv

Bei allen 97 Patientinnen des Gesamtkollektivs wurde eine Untersuchung des Differenzierungsgrades des Tumors durchgeführt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Mehrheit der Patientinnen (58%) einen G2 Tumor aufweist (n=56).

Bei 17% der Patientinnen lag ein G1 Tumor vor, womit der Anteil dieser Tumore am Patientenkollektiv am geringsten ausfällt (n=17).

Bei 25% der Patientinnen lag ein G3 Tumor vor (n= 24) (s. Tabelle 2).

3.7 Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut in Abhängigkeit des Tumorgradings

3.7.1 Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut zwischen Patienten mit G1 und G2 Tumor

Bei Patientinnen mit einem G1 Tumor im Vergleich zu Patientinnen mit einem G2 Tumor zeigte sich keine signifikante Abweichung der absoluten Zahl der T-Lymphozyten, T-Helferzellen, zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen, und B-Lymphozyten pro μl Blut (s. Tabelle 6).

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD25, CD38, CD28, CD95 und des TCR-Rezeptors bei den jeweiligen Lymphozytensubpopulationen zeigt keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 6).

Die Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46 auf den NK-Zellen zeigt ebenfalls keine signifikante Veränderung (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit einem G1 Tumor im Vergleich zu Patientinnen mit einem G2 Tumor

Subpopulation	Absolute Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit G1 Stadium Mammakarzinom Mittelwert \pm Standardabweichung	Absolute Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit G2 Stadium Mammakarzinom Mittelwert \pm Standardabweichung	P-Wert
T-Lymphozyten	1297 \pm 630	1251 \pm 491	0,99
CD25	471 \pm 224	405 \pm 240	0,26
CD28	1063 \pm 400	1061 \pm 422	0,89
CD95	483 \pm 418	453 \pm 265	0,64
TCR ζ	637 \pm 542	631 \pm 328	0,40
CD38	590 \pm 280	637 \pm 270	0,66
Th-Zellen (CD4)	616 \pm 331	584 \pm 288	0,81
CD25	357 \pm 168	313 \pm 176	0,30
CD28	580 \pm 276	564 \pm 274	0,84
CD95	350 \pm 216	342 \pm 169	0,77
TCR ζ	167 \pm 158	142 \pm 120	0,63
CD38	326 \pm 149	306 \pm 154	0,65
Tc-Zellen (CD8)	484 \pm 308	456 \pm 266	0,79
CD28	322 \pm 164	327 \pm 200	0,79
CD95	176 \pm 156	155 \pm 98	0,93
TCR ζ	224 \pm 243	211 \pm 134	0,52
CD38	251 \pm 143	243 \pm 158	0,59
T-reg-Zellen	111 \pm 142	58 \pm 22	0,13
B-Lymphozyten	146 \pm 78	135 \pm 89	0,38
NK-Zellen (CD16+/56+)	85 \pm 60	111 \pm 65	0,21
NKG2D	6 \pm 5	8 \pm 9	0,19
Nkp46	4 \pm 5	6 \pm 7	0,28
Nkp30	5 \pm 5	7 \pm 8	0,76

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

Da keine signifikanten Unterschiede zwischen G1 und G2 Tumoren festgestellt werden konnten, wurden die Patienten mit G1 und G2 Tumoren als eine Gruppe zusammengefasst und mit der Gruppe der Patientinnen mit G3 Tumoren verglichen (s. Tabelle 7).

3.7.2 Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut bei Patienten mit gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1+G2) und Patienten mit wenig differenzierten Tumoren (G3)

Die absolute Zahl der NK-Zellen pro μl Blut zeigte sich bei Patientinnen mit wenig differenzierten Tumoren (G3) im Vergleich zu Patientinnen mit gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1+G2) signifikant vermindert (CD16+/56+: p-Wert= 0,03).

Die absolute Anzahl der NKG2D, Nkp30 und Nkp46 exprimierenden NK-Zellen pro μl Blut zeigt in Abhängigkeit des Gradings eine signifikante Veränderung (CD16+/56+/NKG2D+: p-Wert = 0,04; CD16+/56+/Nkp46+: p-Wert= 0,02; CD16+/56+/Nkp30+: p= 0,04) (s. Tabelle 7).

Die absolute Anzahl der NKG2D+ NK-Zellen pro μl Blut der Patientinnen mit G3 Tumoren ist im Vergleich zu Patientinnen mit G1 oder G2 Tumor signifikant vermindert (p= 0,04) (Tabelle 7).

Die Zahl der Nkp46+ bzw. Nkp30+ NK-Zellen pro μl Blut erwies sich bei Patientinnen mit G3 Tumor ebenfalls im Vergleich zu den Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren, als signifikant erniedrigt (p = 0,02; p= 0,04) (s. Tabelle 7).

Zudem zeigen sich bei den T-Helferzellen ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des Oberflächenmoleküls CD95.

Die absolute Anzahl der CD3+/CD4+/CD95+ T-Lymphozyten pro μl Blut erwies sich bei Patientinnen mit einem G3 Tumor im Vergleich zu Patientinnen mit G1 oder G2 Tumor als statistisch signifikant erhöht (p=0,03) (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit G3 Tumoren

Subpopulation	Absolute Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit G1 und G2 Stadium Mammakarzinom Mittelwert \pm Standardabweichung	Absolute Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit G3 Stadium Mammakarzinom Mittelwert \pm Standardabweichung	P-Wert
T-Lymphozyten	1256 \pm 475	1274 \pm 578	0,97
CD25	421 \pm 237	433 \pm 229	0,59
CD28	1066 \pm 402	1087 \pm 428	0,74
CD95	444 \pm 263	518 \pm 378	0,47
TCR ζ	619 \pm 312	668 \pm 497	0,76
CD38	634 \pm 270	578 \pm 255	0,36
Th-Zellen (CD4)	579 \pm 283	697 \pm 333	0,09
CD25	318 \pm 176	392 \pm 191	0,07
CD28	559 \pm 269	670 \pm 292	0,06
CD95	333 \pm 169	426 \pm 199	0,03
TCR ζ	141 \pm 115	193 \pm 160	0,19
CD38	308 \pm 153	322 \pm 127	0,41
Tc-Zellen (CD8)	457 \pm 262	425 \pm 246	0,43
CD28	328 \pm 195	294 \pm 134	0,60
CD95	153 \pm 99	165 \pm 135	0,82
TCR ζ	206 \pm 131	212 \pm 196	0,68
CD38	245 \pm 155	196 \pm 96	0,13
T-reg-Zellen	69 \pm 72	72 \pm 28	0,09
B-Lymphozyten	135 \pm 84	172 \pm 113	0,09
NK-Zellen (CD16+/56+)	105 \pm 64	79 \pm 57	0,03
NKG2D	8 \pm 8	5 \pm 7	0,02
Nkp46	6 \pm 6	3 \pm 4	0,01
Nkp30	7 \pm 8	4 \pm 5	0,02

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

3.8 Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Knochenmark in Abhängigkeit des Tumorgradings

Zwischen G1 und G2 Tumoren zeigten sich in Abhängigkeit des Gradings keine signifikanten Veränderungen der absoluten Anzahl der jeweiligen Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen pro μl Knochenmark (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen mit G1 Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit G2 Tumoren

Subpopulation	Absolute Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen mit G1 Stadium Mammakarzinom Mittelwert \pm Standardabweichung	Absolute Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen mit G2 Stadium Mammakarzinom Mittelwert \pm Standardabweichung	P-Wert
T-Lymphozyten	1905 \pm 851	1877 \pm 684	0,99
CD25	499 \pm 254	433 \pm 193	0,42
CD28	1498 \pm 626	1489 \pm 494	0,94
CD95	964 \pm 568	725 \pm 326	0,35
TCR ζ	953 \pm 620	954 \pm 517	0,92
CD38	1011 \pm 356	1103 \pm 415	0,86
Th-Zellen (CD4)	819 \pm 482	730 \pm 330	0,98
CD25	437 \pm 246	364 \pm 187	0,76
CD28	756 \pm 419	683 \pm 315	0,96
CD95	533 \pm 330	417 \pm 202	0,77
TCR ζ	271 \pm 243	195 \pm 163	0,55
CD38	444 \pm 228	423 \pm 216	0,94
Tc-Zellen (CD8)	695 \pm 442	733 \pm 433	0,85
CD28	474 \pm 210	482 \pm 240	0,80
CD95	350 \pm 275	286 \pm 211	0,88
TCR ζ	329 \pm 313	373 \pm 317	0,76
CD38	367 \pm 214	404 \pm 215	0,65
T-reg-Zellen	82 \pm 55	70 \pm 64	0,88
B-Lymphozyten	379 \pm 203	312 \pm 216	0,49
NK-Zellen (CD16+/56+)	225 \pm 151	259 \pm 140	0,71
NKG2D	14 \pm 15	21 \pm 19	0,42
Nkp46	8 \pm 9	14 \pm 10	0,18
Nkp30	8 \pm 8	15 \pm 12	0,24

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren wurden daher ebenfalls zu einer Gruppe zusammengefasst und mit Patientinnen mit G3 Tumoren verglichen.

Im Gegensatz zur Analyse der Lymphozytensubpopulationen im Blut zeigt sich im Knochenmark kein signifikanter Unterschied der absoluten Anzahl der CD16+/56+, CD16+/56+/NKG2D+, CD16+/56+/Nkp46+, CD16+/56+/Nkp30+ Zellen pro μl Knochenmark (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μl Knochenmark bei Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit G3 Tumoren

Subpopulation	Absolute Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen mit G1 +2 Stadium Mittelwert \pm Standardabweichung	Absolute Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen mit G3 Stadium Mittelwert \pm Standardabweichung	P-Wert
T-Lymphozyten	1882 \pm 704	2180 \pm 1133	0,30
CD25	448 \pm 205	486 \pm 277	0,56
CD28	1492 \pm 511	1769 \pm 935	0,13
CD95	774 \pm 386	1022 \pm 583	0,12
TCR ζ	954 \pm 528	887 \pm 613	0,54
CD38	1085 \pm 400	1230 \pm 635	0,26
Th-Zellen (CD4)	746 \pm 358	679 \pm 342	0,58
CD25	378 \pm 197	342 \pm 178	0,78
CD28	695 \pm 331	661 \pm 326	0,85
CD95	439 \pm 231	457 \pm 242	0,70
TCR ζ	207 \pm 180	149 \pm 140	0,20
CD38	425 \pm 215	353 \pm 162	0,34
Tc-Zellen (CD8)	722 \pm 428	886 \pm 537	0,21
CD28	478 \pm 231	614 \pm 317	0,07
CD95	298 \pm 222	423 \pm 300	0,15
TCR ζ	363 \pm 312	376 \pm 367	0,89
CD38	395 \pm 212	466 \pm 268	0,32
T-reg-Zellen	72 \pm 62	57 \pm 31	0,51
B-Lymphozyten	324 \pm 212	505 \pm 451	0,14
NK-Zellen (CD16+/56+)	252 \pm 140	3235 \pm 220	0,15
NKG2D	20 \pm 18	27 \pm 23	0,23
Nkp46	13 \pm 10	16 \pm 14	0,61
Nkp30	14 \pm 11	14 \pm 15	0,90

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

3.9 Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Blut in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Knochenmark

Es zeigt sich keine Veränderung der peripheren Immunität im Zusammenhang mit dem Auftreten von disseminierten Zellen im Knochenmark.

Weder bei der quantitativen Anzahl der Lymphozyten pro μl Blut, noch bei der Analyse der Expression der Oberflächenmoleküle, konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Auch die quantitative Anzahl der NK-Zelle, sowie deren Expression der aktivierenden Rezeptoren, zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen ohne Tumorzell dissemination im Vergleich zu Patientinnen mit Tumorzell dissemination

Subpopulation	Absolute Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen ohne DTC Mittelwert \pm Standardabweichung	Absolute Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen mit DTC Mittelwert \pm Standardabweichung	P-Wert
T-Lymphozyten	1269 \pm 492	1356 \pm 581	0,43
CD25	431 \pm 236	460 \pm 267	0,72
CD28	1077 \pm 396	1172 \pm 482	0,44
CD95	479 \pm 310	504 \pm 293	0,66
TCR ζ	633 \pm 374	685 \pm 410	0,64
CD38	627 \pm 272	611 \pm 210	0,99
Th-Zellen (CD4)	612 \pm 283	678 \pm 367	0,52
CD25	344 \pm 175	374 \pm 238	0,83
CD28	592 \pm 262	665 \pm 364	0,51
CD95	364 \pm 168	404 \pm 247	0,78
TCR ζ	149 \pm 126	176 \pm 113	0,37
CD38	316 \pm 146	300 \pm 157	0,76
Tc-Zellen (CD8)	458 \pm 265	441 \pm 218	0,82
CD28	324 \pm 187	321 \pm 135	0,59
CD95	165 \pm 117	141 \pm 78	0,96
TCR ζ	211 \pm 155	193 \pm 134	0,87
CD38	237 \pm 148	197 \pm 92	0,65
T-reg-Zellen	72 \pm 70	70 \pm 33	0,47
B-Lymphozyten	147 \pm 97	159 \pm 83	0,53
NK-Zellen (CD16+/56+)	96 \pm 63	104 \pm 79	0,98
NKG2D	7 \pm 8	7 \pm 10	0,87
Nkp46	5 \pm 6	4 \pm 4	0,87
Nkp30	6 \pm 7	5 \pm 6	0,94

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

3.10 Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Lymphozyten- und NK-Zellensubpopulationen im Knochenmark in Abhängigkeit der Tumorzell dissemination im Knochenmark

In Tabelle 11 zeigt sich eine signifikante Korrelation der Expression der TCR ζ -Kette des TCR-Rezeptors der T-Lymphozyten im Knochenmark mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (1002 ± 554 CD3+/TCR ζ + pro μ l Knochenmark bei DTC (-) vs. 655 ± 322 CD3+/TCR ζ + pro μ l Knochenmark bei DTC (+)).

Die Expression von TCR ζ der T-Lymphozyten des Knochenmarks erwies sich bei Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTC+) im Vergleich zu Patientinnen ohne disseminierte Zellen im Knochenmark (DTC-) als erniedrigt.

Die absolute Anzahl der NK-Zellen pro μ l Knochenmark zeigte im Hinblick auf das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark keine signifikante Veränderung.

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten Anzahl an Zellen / μl Blut bei Patientinnen ohne Tumorzelldissemination im Vergleich zu Patientinnen mit Tumorzelldissemination

Subpopulation	Absolute Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen ohne DTC Mittelwert \pm Standardabweichung	Absolute Anzahl an Zellen / μl KM bei Patientinnen mit DTC Mittelwert \pm Standardabweichung	P-Wert
T-Lymphozyten	1993 \pm 843	1721 \pm 595	0,41
CD25	466 \pm 218	402 \pm 249	0,23
CD28	1582 \pm 656	1396 \pm 428	0,53
CD95	856 \pm 460	688 \pm 285	0,34
TCR ζ	995 \pm 556	655 \pm 322	0,04
CD38	1132 \pm 463	1050 \pm 460	0,49
Th-Zellen (CD4)	750 \pm 365	628 \pm 276	0,22
CD25	381 \pm 193	309 \pm 194	0,16
CD28	702 \pm 338	615 \pm 280	0,31
CD95	453 \pm 235	383 \pm 222	0,19
TCR ζ	207 \pm 182	131 \pm 87	0,25
CD38	420 \pm 212	354 \pm 171	0,34
Tc-Zellen (CD8)	777 \pm 474	673 \pm 299	0,79
CD28	515 \pm 268	474 \pm 167	0,75
CD95	338 \pm 255	258 \pm 142	0,43
TCR ζ	391 \pm 339	233 \pm 120	0,17
CD38	418 \pm 234	378 \pm 171	0,80
T-reg-Zellen	70 \pm 60	60 \pm 34	0,68
B-Lymphozyten	360 \pm 289	393 \pm 298	0,83
NK-Zellen (CD16+/56+)	273 \pm 156	274 \pm 202	0,81
NKG2D	22 \pm 20	16 \pm 11	0,70
Nkp46	14 \pm 11	11 \pm 11	0,51
Nkp30	14 \pm 13	11 \pm 10	0,47

Signifikanter p-Wert: < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

4 Diskussion

4.1 Immunosurveillance in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums

Bereits 1957 formulierten Burnet und Thomas die Hypothese der "cancer immunosurveillance", die postuliert, dass ein intaktes Immunsystem Tumor-spezifische Antigene erkennt und durch die darauffolgend ausgelöste spezifische Immunantwort die Entstehung des Tumors verhindert wird. [46, 52]. Die Immunabwehr und die Entstehung sowie Progression von malignen Erkrankungen stehen in einem direkten Einfluss zueinander.

In vielen Studien wurde bereits die Einflussnahme von Tumorzellen auf die Expressionsmuster, Aktivierbarkeit und Funktionsfähigkeit von Immunzellen nachgewiesen.

So zeigten Mamessier et al. eine verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D und Nkp30 und eine hieraus resultierende verminderte Aktivierbarkeit von NK-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Tumorzellen des Mammakarzinoms [26].

Gruber et al. konnten eine verminderte CD28- und TCR ζ -Expression sowie eine erhöhte CD95-Expression der peripheren zytotoxischen T-Lymphozyten bei Patientinnen mit Mammakarzinom im Vergleich zu gesunden Patienten feststellen [29].

De Boniface et al. konnten ebenfalls eine Veränderung der TCR ζ -Expression der peripheren T-Lymphozyten bei Vorliegen eines Tumors feststellen, die sich nach chirurgischer Entfernung des Tumors wieder den Normwerten näherte [33].

Diese Studien zeigen die Veränderungen der Immunzellen bei Vorliegen eines Tumors im Vergleich zu einem gesunden Organismus auf.

In der vorliegenden Arbeit wird jedoch verglichen, ob bei bereits manifester Tumorerkrankung der Differenzierungsgrad des Tumors die zelluläre Immunität beeinflusst.

Hierbei konnten folgende Aspekte beobachtet werden:

1. Bei Patientinnen mit wenig differenzierten Tumoren (G3) lag im Vergleich zu Patientinnen mit besser differenzierten Tumoren (G1+G2) eine verminderte absolute Anzahl der peripheren NK-Zellen vor.
2. Die peripheren NK-Zellen der Patientinnen mit wenig differenzierten Tumoren (G3) wiesen eine verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp46 sowie Nkp30 im Vergleich zu Patientinnen mit besser differenzierten Tumoren (G1+ G2) auf.
3. Periphere T-Helferzellen zeigten bei Patientinnen mit wenig differenzierten Tumoren (G3) eine erhöhte Expression von CD95 als bei Patientinnen mit besser differenzierten Tumoren (G1+G2).
4. Im Kompartiment des Knochenmarks konnte in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades weder bei den NK-Zellen noch bei den T-Lymphozyten eine Veränderung der absoluten Anzahl der Immunzellen oder deren Expressionsmuster beobachtet werden.

Die vorgelegten Ergebnisse deuten auf eine verminderte Funktionalität und Einschränkung des peripheren Immunsystems bei Vorliegen eines undifferenzierten Tumors hin.

4.1.1 Phasen der Immunosurveillance

Nach heutigem Kenntnisstand kann der Prozess der Immunosurveillance in drei Phasen gegliedert werden. In der ersten, sogenannten Eliminierungsphase ist das Immunsystem in der Lage, die noch stark immunogenen Tumorzellen zu detektieren und zu eliminieren [47].

Die frühe Phase der Tumorzellbekämpfung erfolgt hierbei primär durch NK-Zellen [47]. Diese eliminieren die Tumorzellen und schütten hierbei IFN- γ aus, welches zu einer weiteren Rekrutierung von NK-Zellen und Makrophagen führt [47].

Die späte Phase erfolgt durch die sich in den benachbarten Lymphknoten differenzierenden CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, die für die jeweiligen Tumorantigene spezifisch sind [47].

Hierauf folgt die "Gleichgewichtsphase". Hierbei liegen im Organismus Tumorzellen vor, die jedoch noch zu keiner manifesten Tumorerkrankung führen. Es herrscht hierbei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Immunantwort und den vorliegenden Tumorzellen. Die Immunantwort ist zu einem gewissen Zeitpunkt jedoch nicht mehr in der Lage alle Tumorzellen zu eliminieren, da auf Grund des Selektionsdrucks Mutationen der Tumorzellen mit geringer Immunogenität entstehen, so dass diese von der Immunabwehr nicht mehr erkannt werden [53].

Anders als bei der vorausgehenden Eliminierungsphase, bei der die Zellen der angeborenen Immunität (Makrophagen, NK-Zellen) ausschlaggebend sind, spielen in der Gleichgewichtsphase vor allem die Zellen der erworbenen Immunität (T-Lymphozyten) eine große Rolle.

Dies konnten Koebel et al. im Tierversuch bestätigen [54]. So wurden Mäuse, die zuvor mit dem karzinogen wirkenden MCA (Methylcholantrene) behandelt wurden und daraufhin keinen klinisch manifesten Tumor entwickelten, immunsupprimiert [54]. Bei der Einschränkung des adaptiven Immunsystems durch gegen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten gerichtete Antikörper erfolgte bei 50% der Mäuse, bei denen zuvor kein klinisch manifester Tumor vorlag, ein schnelles Tumorstadium [54]. Dahingegen konnte bei Ausschaltung der angeborenen Immunität durch Antikörper, die die NK-Zell Funktion und Aktivierung verhindern, kein vermehrtes Tumorstadium festgestellt werden [54]. Daher erschließt sich, dass in der "Gleichgewichtsphase" der Tumorentstehung das erworbene Immunsystem maßgeblich verantwortlich ist, während in der Eliminierungsphase sowohl das angeborene als auch erworbene Immunsystem beteiligt sind.

In der darauffolgenden und letzten Phase, die als "Entkommensphase" bezeichnet wird, sind die Mutationen der Tumorzellen soweit fortgeschritten, dass die Tumorzellen weder vom angeborenen noch adaptiven Immunsystem erkannt werden können und der Tumor somit ungehindert wachsen kann [53].

Nach diesem Prinzip der Immunosurveillance sind somit die ersten mit den Tumorzellen in Kontakt tretenden Zellen die NK-Zellen [47].

Sie stellen die erste Tumorabwehrbarriere dar.

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine verminderte absolute Anzahl der peripheren NK-Zellen bei Patientinnen mit G3-Tumor festgestellt werden.

Die Ausbildung eines undifferenzierten, klinisch aggressiveren, G3 Tumors könnte somit durch Einschränkung der hauptsächlich von den NK-Zellen getragenen Immunantwort in der Eliminierungsphase begünstigt werden.

4.1.2 NK-Zellaktivität

NK-Zellen besitzen, im Gegensatz zu den T-Lymphozyten, keine spezifischen Rezeptoren um das jeweilige Antigen zu erkennen, sondern agieren unspezifisch. Da hierdurch keine Bildung und Rekrutierung von spezifischen Effektorzellen erforderlich ist und die NK-Zelle selbst als Effektorzelle fungieren kann, erfolgt die Reaktion der NK-Zelle, im Vergleich zur Reaktion der T-Lymphozyten, schnell und unspezifisch [55].

Eine reduzierte NK-Zellaktivität wurde bereits in den 80er Jahren bei Patienten mit familiär gehäuft auftretenden Melanomen [48], sowie bei einem Vergleich von Patienten mit hoher familiärer Inzidenz von malignen Erkrankung im Vergleich zu gesunden Patienten beschrieben [49].

Strayer et al. stellten auch im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom bei Patienten mit hoher familiärer Inzidenz von Brustkrebserkrankungen eine signifikant verminderte NK-Zellaktivität im peripheren Blut im Vergleich zu Patienten mit geringerer familiärer Inzidenz fest [56].

Imai et al. konnten in einer prospektiven Studie zudem nachweisen, dass die Inzidenzrate für das Auftreten von Tumorerkrankungen bei Patienten mit niedriger NK-Zellaktivität im peripheren Blut deutlich höher ausfiel als bei Patienten mit hoher NK-Zellaktivität im peripheren Blut [57].

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp46 und Nkp30 der peripheren NK-Zellen von Patientinnen mit einem G3 Tumor festgestellt werden.

Hierdurch zeigt sich also eine verminderte NK-Zellaktivität im peripheren Blut bei Patientinnen mit wenig differenzierten Tumoren.

NK-Zellen sind sowohl an der Tumor-Immunüberwachung als auch an der Verhinderung der Entstehung von Metastasen bei bereits manifester Tumorerkrankung beteiligt [58]. So konnten Bidwell et al. zeigen, dass in Zellen einer Knochenmetastase des Mammakarzinoms die Expression des Gens, welches den Interferon Typ I Regulator IRF-7 codiert, supprimiert ist [59]. Interferon Typ I ist in der Lage die NK-Zellaktivität zu steigern und ist somit ein wichtiger Faktor für eine intakte Immunabwehr [60]. Die Entstehung von Knochenmetastasen steht somit in einem Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Immunabwehr durch Herabregulierung der NK-Zellaktivität.

Maßgeblich an der Aktivierung und Hemmung der NK-Zellaktivität beteiligt sind die NK-Zell-Rezeptoren aus der C-Typ-Lektin Familie, die mit einem Protein der NKG2- Familie einen funktionellen Rezeptorkomplex bilden [41]. Relevant sind hierbei die Proteine NKG2A, -B, -C und -D.

Hierbei wirken NKG2A und -B inhibitorisch, indem sie körpereigene MHC-I-Proteine erkennen und daraufhin die Signalkaskade der aktivierenden Rezeptoren blockieren und somit eine Aktivierung verhindern [26, 41].

Das in dieser Arbeit untersuchte Protein NKG2D hingegen wirkt aktivierend.

Hierbei nimmt NKG2D eine gesonderte Rolle ein, da es, anders als die anderen NKG2-Komplexe, nicht mit MHC-I-Molekülen, sondern mit spezifischen Liganden interagiert [41].

Die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Rezeptoren Nkp30 und Nkp46 werden den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (engl. NCR) zugeordnet [41]. Auch sie reagieren unabhängig der MHC-I-Molekülausprägung und werden durch spezifische Liganden aktiviert.

Somit können NK-Zellen durch fehlende, oder veränderte MHC-I-Expression bei entarteten Zellen, sowie durch Kontakt zu tumorspezifischen Antigenen, die Tumorzellen als erste Barriere bekämpfen.

Tumorzellen haben jedoch Wege entwickelt, die Immunabwehr durch NK-Zellen zu umgehen.

Mamessier et al. untersuchten die Phänotypen von NK-Zellen nach 48-stündiger direkter und indirekter Inkubation mit Brustkrebszellen unterschiedlicher Subtypen [26]. Hierbei zeigte sich unabhängig des Subtyps des Tumors eine Veränderung des Phänotyps der NK-Zellen hin zu einer verminderten immunogenen Funktion der NK-Zelle [26]. So zeigte sich eine deutlich verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D und Nkp30. Der inhibierende Rezeptor NKG2A wurde hingegen vermehrt exprimiert. Mamessier et al. stellten hierbei fest, dass vom Tumor ausgeschüttete Faktoren wie beispielsweise TGF- β 1 die Zellfunktion von NK-Zellen reduzierten [61].

Die im Zellüberstand enthaltenen löslichen Faktoren, vor allem TGF- β 1, sowie PGE2, wiesen eine hohe negative Korrelation mit den für die Zytotoxizität der NK-Zellen essentiellen Molekülen auf [61].

Das ebenfalls von den Tumorzellen sezernierte, nicht zellgebundene, MICA (soluble MICA = sMICA) bewirkt eine Downregulation der aktivierenden Rezeptoren NKG2D sowie Nkp30 [26].

Der Vorgang der Internalisierung von NKG2D-Rezeptoren ist ursprünglich physiologisch und dient der Verhinderung einer überschießenden Reaktion der NK-Zellen. Hierbei führt der Kontakt von NK-Zellen mit Zellen, die NKG2D-Liganden membrangebunden tragen, physiologisch zu einer Internalisierung und somit Downregulation der NKG2D-Rezeptoren auf den NK-Zellen [62].

Dieser Internalisierungsprozess der Rezeptoren erfolgt durch Quervernetzung der NKG2D-Rezeptoren durch Bindung an Zellen mit membrangebundenen Liganden [62].

Die verminderte Expression von NKG2D-Rezeptoren wird effektiver durch membrangebundene Liganden erzielt als durch von Tumorzellen sezernierte gelöste Liganden [62]. Somit kann ein vermehrtes Auftreten von Zellen mit membrangebundenen NKG2D-Liganden zu einer Einschränkung der NK-Zell-Funktion führen.

Crane et al. konnte diesen Effekt ebenfalls bei Patienten mit Brustkrebs beobachten [63]. So zeigte sich bei Mammakarzinom Patientinnen ein

gehäuftes Auftreten von NKG2D- Liganden auf zirkulierenden Monozyten [63]. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der vermehrte Nachweis von LDH5 (Laktatdehydrogenase 5) in Patientenseren, mit einem vermehrten Vorhandensein von NKG2D-Liganden tragenden Monozyten korrelierte [63]. Crane et al. stellten hierbei fest, dass Glioblastom-Tumorzellen vermehrt LDH5 sezernierten und dieses die Transkription und Expression von NKG2D Liganden auf Monozyten förderte [63]. Die von den Tumorzellen ausgeschüttete Laktatdehydrogenase 5 ist somit in der Lage die NK-Zellfunktion über Liganden-exprimierende Monozyten zu beeinträchtigen.

Sowohl Crane et al., als auch Mamessier et al., stellten ebenfalls fest, dass aggressivere und undifferenzierte Primärtumore (G3) vermehrt TGF- β 1 sezernieren und dieses in der Lage ist, die NK-Zellfunktion direkt zu beeinträchtigen [61, 63].

TGF- β 1 ist hierbei in der Lage die Expression des NKG2D-Rezeptors zu verringern und so die NK-Zellfunktion stark zu beeinträchtigen [61].

Mamessier et al. konnte nachweisen, dass aggressivere Brustkrebs Tumore vermehrt TGF- β 1-produzierende Zellen besitzen und somit stärker die NK-Zellfunktion beeinträchtigen [61].

In den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen zeigte sich ebenfalls bei Vergleich der Expressionsmuster der Rezeptoren der NK-Zellen im peripheren Blut bei gut differenzierten Tumoren (G1+G2) im Vergleich zu schlecht differenzierten und aggressiveren Tumoren (G3) eine signifikante Verringerung der Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 sowie Nkp46.

Dahingegen zeigten in den Ergebnissen dieser Arbeit die NK-Zellen des Knochenmarks, die sich somit weder im Mikroenvironment des Tumors befinden noch im peripheren Blutsystem zirkulieren, keine Veränderung der Expression der aktivierenden Rezeptoren in Abhängigkeit des Gradings des Primärtumors.

Die signifikante Veränderung des Expressionsmusters der NK-Zellen im peripheren Blut in Abhängigkeit des Gradings könnte somit auf die beschriebene vermehrte Freisetzung von immunsupprimierend wirkenden Botenstoffen (TGF- β 1) durch G3 Tumore [61, 63] beruhen.

4.1.3 T-Lymphozyten-Aktivität

In den hier vorgelegten Ergebnissen konnte eine Beeinflussung der T-Lymphozyten-Aktivität in Abhängigkeit des Gradings festgestellt werden. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Expression des Oberflächenmoleküls CD95 der peripheren T-Helferzellen bei Vorliegen eines G3 Tumors. Das Oberflächenmolekül CD95 wird auch als Fas-Rezeptor bezeichnet und dient der physiologischen Einleitung der Apoptose der T-Lymphozyten. Der Fas-Rezeptor gehört zur Familie der Tumor-Nekrose Faktoren (TNF). Bei Interaktion mit dem für diesen Rezeptor spezifischen Liganden FasL wird eine durch Caspasen getragene Apoptose eingeleitet [38]. Dieser Mechanismus dient dazu, eine überschießende Reaktion der T-Lymphozyten zu verhindern. So exprimieren bereits zuvor aktivierte T-Zellen vermehrt FasL und gehen hiermit in höherem Maße in Apoptose über [39]. Mullauer et al. konnten zeigen, dass Zellen des Mammakarzinoms vermehrt FasL exprimieren und hierdurch ebenfalls in der Lage sind, eine vermehrte Apoptose der Lymphozyten zu induzieren [40]. In Bezug auf maligne Erkrankungen konnten Gruber et al. feststellen, dass bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom im Vergleich zu gesunden Patienten vermehrt CD95 exprimierende periphere zytotoxische T-Lymphozyten vorlagen. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich in Abhängigkeit des Gradings eine vermehrte Expression von CD95 auf T-Helfer-Lymphozyten des peripheren Blutes bei Patienten mit G3 Tumoren. Die Fähigkeit des G3 Tumors die periphere Immunantwort durch die Steigerung der Apoptosebereitschaft der, für die Weiterleitung der Immunantwort essenziellen, T-Helferzellen zu beeinträchtigen könnte somit eine bedeutende Ursache für die vermehrte Invasivität und Aggressivität des G3 Tumors darstellen. T-Lymphozyten des Knochenmarks zeigten jedoch weder in Abhängigkeit des Gradings noch bei einem Vorliegen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark eine veränderte T-Zell-Aktivität. Durch welche Mechanismen der G3 Tumor in der Lage ist auf die CD95-Expression der peripheren T-Helferzellen Einfluss zu nehmen sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

4.2 Das Grading und die Tumorzell dissemination

Bereits 1996 konnten Diel et al. einen Zusammenhang zwischen dem Grading eines Tumors und einem vermehrten Tumorzell-Shedding feststellen [64].

Die Detektion von Tumorzellen im Knochenmark korrelierte hierbei mit dem Tumorgrading [64].

Sowohl Kasimir et al., als auch Braun et al., konnten feststellen, dass das Auftreten von disseminierten Zellen im Knochenmark ebenfalls mit einem erhöhten Tumorgrading korreliert [50, 65].

In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu einem erhöhten prozentualen Anteil von G3 Tumoren bei DTC (+) Patienten im Vergleich zu DTC (-) Patienten (40% vs. 24%).

4.2.1 Triple Negative Tumore

Triple-negative Tumore gelten als die aggressivste Form des Mammakarzinoms und zeichnen sich durch ihre fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren und HER2/neu aus.

Das Vorliegen dieses Tumors korreliert mit einem höheren Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven und einem generell schlechterem Outcome [15]. Bei diesen Tumoren liegt auch meist ein G3 Grading vor [15].

So stellten Bauer et al. bei 76% der in ihrem Patientenkollektiv enthaltenen Triple-negative Tumoren eine schlechte bis nicht vorhandene Differenzierung fest, bei den restlichen Brustkrebsarten lag der Anteil der schlecht bis nicht differenzierten Tumore hingegen nur bei 28% [66].

Auch in den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen konnte eine signifikante Korrelation des Gradings mit der Hormonrezeptorausprägung (ER/PR-Status) festgestellt werden.

So war der prozentuale Anteil der Patientinnen deren Tumor keine Östrogen- und Progesteronrezeptoren exprimierten, bei Patientinnen mit G3 Tumoren höher als bei Patientinnen mit G1 und G2 Tumoren (s. Tabelle 3).

Fehm et al. untersuchten das Blut von 431 Patienten mit primären Mammakarzinom und konnten bei 58 Patienten CTCs nachweisen [67].

Die höchste CTC-positiv Rate konnte hierbei bei den Triple-negativen Tumoren festgestellt werden [67].

Da wie bereits aufgeführt wurde, bei Triple-negativen Tumoren meist ein G3 vorliegt, könnte dies einen weiteren Hinweis darauf sein, dass bei Vorliegen eines G3 Tumors eine erhöhte Invasivität des Tumors vorliegt und dies in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von CTCs im Blut resultiert. Hieraus ergibt sich eine weitere Interaktionsmöglichkeit der peripheren NK-Zellen mit den Tumorzellen.

Die von uns beobachtete verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46 der NK-Zellen im peripheren Blut in Abhängigkeit des Gratings (G1+G2 vs. G3) könnte somit auf folgende Mechanismen zurückgeführt werden:

- (1) G3 Tumore sezernieren vermehrt auf NK-Zellen suppressiv wirkende Botenstoffe (z.B. TGF- β 1) [61, 63].
- (2) G3 Tumore verhalten sich invasiver und weisen öfter disseminierte Tumorzellen im Blut und im Knochenmark auf als G1+ G2 Tumore [50, 64, 65, 67], wodurch eine erhöhte Interaktionsmöglichkeit mit peripheren NK-Zelle bestehen könnte.

4.2.2 Tumorzell dissemination

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich lediglich eine Veränderung des Expressionsmusters der peripheren NK-Zellen in Abhängigkeit des Vorliegens eines G3 Tumors im Vergleich zu besser differenzierten Tumoren. NK-Zellen im Knochenmark hingegen zeigte keine statistisch signifikante Veränderung ihrer Rezeptorausprägung in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums des Primärtumors.

Grund hierfür könnte die Lokalisation in einem tumorfernen Kompartiment sein, da hierdurch die vom Tumor sezernierten Botenstoffe keine Wirkung entfalten können.

Wie bereits erwähnt können jedoch bei G3 Tumore auch vermehrt disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden [50].

Dies führt zu der Annahme, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark durch ihre Nähe zu den NK-Zellen im Knochenmark dieselben Effekte auslösen könnten, wie es bei peripheren NK-Zellen der Fall ist.

Bei Vorhandensein von disseminierten Zellen im Knochenmark bestünde ein potenzieller Kontakt der Tumorzellen mit den NK-Zellen und es könnte hier wiederum zu einer Beeinflussung der Rezeptorexpression und Funktionsfähigkeit der NK-Zellen kommen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen jedoch bei den NK-Zellen des Knochenmarks keine signifikante Veränderung der Expression der NK-Rezeptoren in Abhängigkeit des Vorhandenseins von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

Eine Erklärung hierfür könnte im Verhalten der disseminierten Zellen liegen.

Man geht davon aus, dass disseminierte Tumorzellen drei unterschiedliche Entwicklungswege durchlaufen können. Im Groben kann der Verlauf der Tumorzell dissemination wie folgt beschrieben werden:

Zunächst erfolgt in Abhängigkeit von Art und Aggressivität des Tumors eine lokale Invasion von Tumorzellen in das umgebende Gewebe. Danach erfolgt eine Intravasation in umliegende Blut- oder Lymphgefäße. Überlebt die Tumorzelle im Laufe der Zirkulation, so erfolgt danach eine Extravasation in einer Umgebung außerhalb des Primärtumorgewebes. Es schließt sich die Kolonisation im neuen Gewebe an und darauffolgend eine, nicht in jedem Fall eintretende, potentielle klinische Manifestation einer Metastase [68].

Ein Großteil der zirkulierenden Tumorzellen wird jedoch im Zuge der Zirkulation im Blut- oder Lymphsystem apoptotisch. Gründe für den Tod der Zellen liegen zum einen in mechanischen Schäden, denen sie im Zuge der Zirkulation in den Gefäßen ausgesetzt sind, und zum anderen, im Angriff durch die ebenfalls im Blut- und Lymphsystem zirkulierenden NK-Zellen [68].

Disseminierte Zellen werden zudem als sogenannte potenzielle Tumor-Stammzellen angesehen. Diese haben die Möglichkeit sich, bei nicht erfolgter Apoptose, in supportiven Nischen, deren Mikroenvironment ähnlich der Nischen sind, in denen auch normale Stammzellen wachsen können, einzunisten und ihr Tumor-Stammzellenpotential beizubehalten [69].

Hierbei stellt das Knochenmark eine bevorzugte Stammzellennische bei Zellen des Prostata- und Brustkarzinoms dar [69].

Hieraus ergibt sich der zweite Weg, den disseminierte Zellen einschlagen können: Der Weg des sogenannten Tumorzellschlafes (engl. tumorcell dormancy). Dies gilt als Bezeichnung für einen Status der Tumorzellen, in dem sie jahrelang ohne proliferative und metastatische Aktivität verweilen können, aus dem sie aber auch wieder „erwachen“ können und zu Metastasen, auch Jahre nach der primären Erkrankung, führen können.

Hierbei werden zwei Modelle des Tumorzellschlafes beschrieben [68].

Der erste Mechanismus liegt in einem proliferativen Stillstand der einzelnen Tumorstammzellen [68]. Der zweite Mechanismus, der vor allem bei einer Massenansammlung von Tumorzellstammzellen beschrieben wird, ist eine Inhibierung des Wachstums durch insuffiziente Vaskularisation, oder einer konstanten Inhibition durch den Angriff des Immunsystems [68].

Das Mikroenvironment des Primärtumors wird durch unterschiedliche Faktoren, die vom Tumor ausgeschüttet werden, so verändert, dass das Immunsystem eingeschränkt wird. Dieser Schutzmechanismus ist in den Organen, die durch die disseminierten Zellen besiedelt werden, zunächst nicht vorhanden, wodurch nur noch die ersten zwei Entwicklungswege eingeschlagen werden können [68]. Entweder erfolgt die Zerstörung der Zelle oder der Übertritt in den Tumorzellschlaf. Welche Mechanismen genau für die Induktion des Tumorzellschlafes und dessen Beibehaltung und die in manchen Fällen eintretenden Wiederaufnahme des Tumorwachstums verantwortlich sind, ist noch nicht hinreichend geklärt.

Man geht davon aus, dass Moleküle der TGF- β Familie sowie das perivaskuläre Milieu den Tumorzellschlaf induzieren, während Umgebungen, die reich an Kollagen Typ I oder Fibronectin sind, den Tumorzellschlaf inhibieren [69].

Den dritten Weg, den disseminierte Zellen einschlagen können, ist der einer klinisch manifesten Metastase. Hierbei kann eine Kompromittierung des Immunsystems oder ein Zusammenbruch der wachstumshemmenden Faktoren zu einer Aktivierung der Tumorzellstammzellen führen und das Tumorwachstum induzieren [69].

Die sich im Patientenkollektiv dieser Arbeit darstellende fehlende Beeinflussung der NK-Zell-Rezeptorexpression im Knochenmark trotz vorliegender disseminierter Zellen könnte durch den Tumorzellschlaf-Status der Tumorzellen bedingt sein.

Wie oben beschrieben liegen diese meistens als Einzelzellen vorliegenden Tumorstammzellen in einem Stadium der proliferativen Stilllegung vor [69].

Man geht, wie bereits beschrieben, von einem nicht proliferativen Status und dem Verbleib im G₀-Zyklusstadium [21], oder von einem Gleichgewicht zwischen aktiven und apoptotischen Zellen mit einer mangelnden Fähigkeit zur Vaskularisierungsinduktion aus [70]. Hierdurch werden vermutlich die sonst in der Umgebung des Primärtumors ausgeschütteten Faktoren, die zu einer Beeinflussung und Einschränkung des Immunsystems führen, nicht ausgeschüttet und die NK-Zellen bleiben unbeeinflusst. Umgekehrt bedeutet dies aber auch, dass Tumorzellen unerkant von Immunzellen jahrelang vorliegen, was das in diversen Studien beschriebene Wiederauftreten von Metastasen noch Jahre nach Therapie des Primärtumors erklären könnte [22, 69], aber auch in einem lebenslangen Tumorzellschlaf ohne das Auftreten von klinisch manifesten Metastasen resultieren kann [23].

4.2.3 Die TCR ζ -Expression

Es stellte sich die Frage, ob DTC, um den Status des Tumorzellschlafs jahrelang aufrecht zu erhalten, ohne zerstört zu werden, andere Immunzellen im Knochenmark beeinflussen können.

In den vorgelegten Ergebnissen konnte eine signifikante Verminderung der TCR ζ exprimierenden T-Lymphozyten im Knochenmark bei Vorhandensein von DTC beobachtet werden.

Durch den TCR-Rezeptor, der aus verschiedenen Unterketten besteht, ist der T-Lymphozyt in der Lage Antigene zu erkennen um anschließend aktiviert zu werden. Das Fehlen der ζ -Kette führt zu einem Ausbleiben der Aktivierung des T-Lymphozyten.

Die verminderte Expression von TCR ζ auf den T-Lymphozyten des Knochenmarks bei Vorhandensein von DTC könnte möglicherweise ein Anhalt für einen Interaktionsmechanismus der einzelnen Tumorzelle mit dem TCR-Rezeptorkomplex der T-Lymphozyten sein. Dies könnte einen Forschungsansatz für die Mechanismen, die es disseminierten Zellen ermöglichen jahrelang vom Immunsystem unerkannt im Knochenmark zu bestehen, darstellen.

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch im peripheren Blut in Abhängigkeit des Vorliegens von disseminierten Zellen im Knochenmark keine signifikante Verminderung der TCR ζ -Ketten-Expression auf den T-Lymphozyten festgestellt werden. In weiteren Studien sollte daher abgeklärt werden, ob das Vorhandensein von CTC im Blut eine Veränderung der TCR ζ -Ketten-Expression der peripheren T-Lymphozyten bewirkt.

In Abhängigkeit des Gradings zeigte sich in den vorgelegten Ergebnissen weder im Knochenmark noch im Blut eine signifikante Veränderung der TCR ζ -Ketten-Expression der T-Lymphozyten.

Auch in der Literatur lassen sich keine konkreten Nachweise für eine Korrelation des Primärtumorgradings mit der TCR ζ -Ketten-Expression der T-Lymphozyten im peripheren Blut oder im Knochenmark finden.

De Boniface et al. jedoch konnten einen Zusammenhang zwischen dem Staging und der Expression der ζ -Kette feststellen. Sie zeigten, dass die ζ -Ketten-Expression bei Patienten mit Stage I Tumoren (T1N0) im Vergleich zu Stage II Tumoren (T0/1N1, T2N0/1, T3N0) statistisch signifikant höher ausfiel [33].

Somit scheint die Größe des Primärtumors sowie der Nachweis einer Lymphknotenmetastase mit einer verminderten TCR ζ -Ketten-Expression der peripheren T-Lymphozyten einherzugehen.

4.3 Beeinflussung der zellulären Immunität im peripheren Blut und Knochenmark

In den im Zuge dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen ist festzuhalten, dass bei Vorliegen eines wenig differenzierten Primärtumors (G3) die absolute Anzahl der peripheren NK-Zellen sowie deren Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46 vermindert ist.

NK-Zellen des Knochenmarks zeigen sich in Abhängigkeit des Gradings des Primärtumors sowohl in ihrer absoluten Anzahl als auch in ihrer Rezeptorexpression unverändert.

Die T-Lymphozyten der Peripherie zeigen in Abhängigkeit des Gradings eine vermehrte Expression von CD95 auf den T-Helferzellen.

Das Vorliegen eines wenig differenzierten Primärtumors korreliert in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit somit mit einer erhöhten Apoptosebereitschaft der peripheren T-Helferzellen.

Das Vorliegen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark korreliert mit einer verminderten TCR ζ -Expression der T-Lymphozyten des Knochenmarks. Die hierdurch eingeschränkte T-Zell-Antwort im Knochenmark könnte zu den Mechanismen zählen, die es disseminierten Tumorzellen ermöglichen jahrelang unerkannt im Knochenmark zu überleben. NK-Zellen des Knochenmarks bleiben durch das Vorliegen von DTC im Knochenmark hinsichtlich der Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46 unverändert.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Mammakarzinom gilt als die am häufigsten auftretende Krebserkrankung der Frau. Hierbei stellen unter anderem der Differenzierungsgrad und die Hormonrezeptor- und HER2/neu-Expression des Tumors, sowie der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut, wichtige Prognosefaktoren dar.

Die Assoziation einer fehlenden Hormonrezeptorexpression mit einem geringen Differenzierungsgrad [15] sowie die häufigere Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines gering differenzierten Tumors [59] konnten bei der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse der klinisch-pathologischen Charakteristika der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ebenfalls festgestellt werden.

Diverse Studien belegen bereits eine Einschränkung des Immunsystems sowie eine verminderte Funktionsfähigkeit der Immunzellen im Zuge eines Tumorleidens [26, 29, 48, 49, 56, 57].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die zelluläre Immunabwehr bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom vom Differenzierungsgrad des Tumors beeinflusst wird. Diesbezüglich wurde zwischen dem peripheren Immunsystem und den Immunzellen im Knochenmarkskompartiment unterschieden und der Fokus auf die NK-Zellen gelegt, da diese noch vor den Lymphozyten mit veränderten Zellen in Kontakt treten [47].

Das Knochenmark und das Blut von insgesamt 97 Patientinnen wurde untersucht. Die Analyse der zellulären Immunität im Knochenmark und im Blut erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach Fluoreszenz-Antikörper-Markierung.

Hierbei zeigte sich, dass bei Patientinnen mit einem G3 Tumor im Vergleich zu Patientinnen mit besser differenzierten Tumoren (G1+G2) sowohl eine signifikant verminderte absolute Anzahl der peripheren NK-Zellen als auch eine signifikant erniedrigte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46 der peripheren NK-Zellen vorlag.

Im Gegensatz hierzu zeigten die NK-Zellen des Knochenmarks in Abhängigkeit des Gradings des Primärtumors keine signifikanten Veränderungen der absoluten Anzahl der NK-Zellen, oder deren Expression der Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46.

Des Weiteren zeigte sich in den vorgelegten Ergebnissen bei Patientinnen mit einem G3 Tumor eine signifikant höhere Expression von CD95 und somit eine höhere Apoptosebereitschaft der peripheren T-Helferzellen im Vergleich zu den peripheren T-Helferzellen der Patientinnen mit besser differenzierten Tumoren (G1 + G2).

Das Immunsystem des Knochenmarks zeigte sich in den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen in Abhängigkeit des Tumorgradings unbeeinflusst.

Erhöhtes Grading korreliert jedoch, wie Kasimir et al. und Braun et al. zeigen konnten, mit einem erhöhten Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark [50,65]. Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit konnte dieser Zusammenhang beobachtet werden.

Es wurden daher die Veränderungen des Immunsystems des Knochenmarks und des Blutes in Abhängigkeit des Vorliegens von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTCs) untersucht.

Hierbei zeigte sich in Abhängigkeit des Vorliegens von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark eine signifikant verminderte TCR ζ -Ketten-Expression der T-Lymphozyten im Knochenmark, wohingegen die absolute Anzahl der T-Lymphozyten sowohl im Knochenmark als auch im Blut unbeeinflusst blieb.

Die eingeschränkte T-Zell Antwort, ausgelöst z.B. durch die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte Expression von TCR ζ , könnte hypothetisch zur Tumorzell dormancy beitragen, in der die disseminierten Tumorzellen im Knochenmark jahrelang unerkannt vom Immunsystem überleben könnten.

Interessanterweise zeigte das Vorliegen von disseminierten Tumorzellen in den hier vorgelegten Ergebnissen keine Beeinflussung der absoluten Anzahl der NK-Zellen im Knochenmark, sowie keine Beeinflussung der Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, Nkp30 und Nkp46.

Dieses Ergebnis bestärkt die Hypothese, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark in einem inaktiven Zustand ohne proliferative Aktivität verharren [21] und hierdurch die zur Beeinflussung von Immunzellen notwendigen Botenstoffe nicht mehr sezerniert werden. Die NK-Zellen des Knochenmarks bleiben hierdurch, wie in den vorgelegten Ergebnissen beschrieben, in der Expression ihrer aktivierenden Rezeptoren unbeeinflusst.

Umgekehrt jedoch könnte der inaktive Zustand der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark verantwortlich dafür sein, dass die Tumorzellen jahrelang für Immunzellen des Knochenmarks, insbesondere für die eigentlich sehr immunkompetenten NK-Zellen, unerkant bleiben.

Im Zuge dieser Arbeit wurde lediglich unter dem Aspekt des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von DTCs im Knochenmark untersucht.

Für zukünftige Studien wäre es interessant, die Aktivität bzw. die ausgeschütteten Botenstoffe der DTCs im Knochenmark in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades des Primärtumors zu untersuchen.

Wie bereits beschrieben sind G3 Tumore prognostisch ungünstig einzustufen und sind, wie in dieser Arbeit gezeigt, in der Lage, die periphere Immunität der NK-Zellen durch Downregulation ihrer aktivierenden Rezeptoren einzuschränken. Unklar bleiben jedoch die Interaktionsmechanismen und Auswirkungen des Vorliegens von disseminierten Tumorzellen auf die Immunzellen des Knochenmarks, speziell bei Vorliegen eines aggressiven und wenig differenzierten Primärtumors.

Der Fokus zukünftiger Studien sollte daher auf die prognostische Wertigkeit der Immunkompetenz im Knochenmark und deren Beeinflussung beispielsweise durch DTCs, die unterschiedlich differenzierten Primärtumoren entstammen, und deren ausgeschüttete Botenstoffe, liegen.

6 Literaturverzeichnis

1. http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/renGkGzAqwKc2/PDF/28oaKVmif0wDk.pdf,
Zugriff: 04.01.2018
2. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c50_brust.pdf?__blob=publicationFile,
Zugriff: 16.08.2016
3. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleWeiblich.html> ,
Zugriff: 15.01.2014
4. Abdulkareem, I.H., *Aetio-pathogenesis of breast cancer*. Niger Med J, 2013. **54**(6): p. 371-5.
5. Riskin-Mashiah, S., *[Infertility, fertility treatment and breast cancer risk]*. Harefuah, 2013. **152**(10): p. 600-4, 623.
6. Couch, F.J., K.L. Nathanson, and K. Offit, *Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention*. Science, 2014. **343**(6178): p. 1466-70.
7. Evans, M.K. and D.L. Longo, *PALB2 mutations and breast-cancer risk*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 566-8.
8. Eschrich, E., et al., *Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(8): p. 813-30.
9. Bettelheim, R., et al., *Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers*. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. Lancet, 1990. **335**(8705): p. 1565-8.
10. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
11. Harbeck, N., et al., *Mammakarzinom - prognostische und prädiktive Faktoren*. Der Onkologe, 2002. **8**(8): p. 808-816.
12. Lobbezoo, D.J., et al., *Prognosis of metastatic breast cancer subtypes: the hormone receptor/HER2-positive subtype is associated with the most favorable outcome*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **141**(3): p. 507-14.
13. Eucker, J. and K. Possinger, *Individualisierte Therapie des Mammakarzinoms*. Dtsch med Wochenschr, 2011. **136**(10): p. 486-491.
14. Kennecke, H., et al., *Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(20): p. 3271-3277.
15. Rakha, E.A., et al., *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. Cancer, 2007. **109**(1): p. 25-32.
16. Janicke, F., et al., *Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(12): p. 913-20.
17. Pantel, K., et al., *Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6326-34.
18. Regierer, A.C. and K. Possinger, *Mammakarzinom: Manual Diagnostik und Therapie ; mit 69 Tabellen*. 2005: Dt. Ärzte-Verlag. p.30-31
19. Bässler, R., *Histopathologie und aktuelle Klassifikationen des Mammakarzinoms*. Der Onkologe, 1998. **4**(10): p. 878-895.
20. Braun, S. and B. Naume, *Circulating and disseminated tumor cells*. J Clin Oncol, 2005. **23**(8): p. 1623-6.

21. Braun, S., et al., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 80-6.
22. Quesnel, B., *Tumor dormancy: long-term survival in a hostile environment*. Adv Exp Med Biol, 2013. **734**: p. 181-200.
23. Fehm, T., et al., *Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(5): p. R60.
24. Pitini, V., C. Arrigo, and M. Righi, *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer, 2005. **104**(6): p. 1332-3; author reply 1333.
25. Lopez-Soto, A., et al., *NKG2D signaling in cancer immunosurveillance*. Int J Cancer, 2015. **136**(8): p. 1741-50.
26. Mamessier, E., et al., *Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition*. Cancer Res, 2011. **71**(21): p. 6621-32.
27. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage ed.* 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. p. 287-297.
28. Kariv, I., A. Truneh, and R.W. Sweet, *Analysis of the site of interaction of CD28 with its counter-receptors CD80 and CD86 and correlation with function*. J Immunol, 1996. **157**(1): p. 29-38.
29. Gruber, I.V., et al., *Down-regulation of CD28, TCR-zeta (zeta) and up-regulation of FAS in peripheral cytotoxic T-cells of primary breast cancer patients*. Anticancer Res, 2008. **28**(2A): p. 779-84.
30. Boise, L.H., et al., *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 87-98.
31. Deng, G. and E.R. Podack, *Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene bcl-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(6): p. 2189-2193.
32. Zhang, H., et al., *Basic residues in the T-cell receptor zeta cytoplasmic domain mediate membrane association and modulate signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(48): p. 19323-8.
33. Boniface, J.D., et al., *Tumor-dependent down-regulation of the zeta-chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function*. Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 129-39.
34. Baniyash, M., *TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 675-87.
35. Sussman, J.J., et al., *Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex*. Cell, 1988. **52**(1): p. 85-95.
36. Bajorat, T. and T. Brandenburger, *Fallbuch Biochemie: 80 Fälle aktiv bearbeiten*. 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p.149-150
37. Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 2006: John Wiley & Sons. p.525
38. Abrahams, V.M., M. Kamsteeg, and G. Mor, *The Fas/Fas ligand system and cancer: immune privilege and apoptosis*. Mol Biotechnol, 2003. **25**(1): p. 19-30.
39. Sharma, K., et al., *Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand*. Pharmacol Ther, 2000. **88**(3): p. 333-47.
40. Mullauer, L., et al., *Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer*. J Pathol, 2000. **190**(1): p. 20-30.

41. Murphy, K.M., et al., *Janeway Immunologie*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag. p.123-129
42. <http://flexikon.doccheck.com/de/NK-Zelle>, Zugriff: 25.11.2016
43. Vantourout, P., et al., *Immunological visibility: posttranscriptional regulation of human NKG2D ligands by the EGF receptor pathway*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(231): p. 231ra49.
44. Anderson, T.J., et al., *Pathology characteristics that optimize outcome prediction of a breast screening trial*. *Br J Cancer*, 2000. **83**.
45. Zwirner, N.W., et al., *Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. **18**(1-2): p. 159-70.
46. Burnet, M., *Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis*. *Br Med Bull*, 1964. **20**: p. 154-8.
47. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-998.
48. Hersey, P., et al., *Low natural-killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives*. *British Journal of Cancer*, 1979. **40**(1): p. 113-122.
49. Strayer, D.R., et al., *Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer*. *Cancer Res*, 1984. **44**(1): p. 370-4.
50. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(8): p. 793-802.
51. Sack, U., H. Walter de Gruyter Gmb, and K.G. Co, *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. 2016, Berlin; Boston: De Gruyter. p.1-10
52. Burnet, M., *Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications*. *Br Med J*, 1957. **1**(5023): p. 841-7.
53. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 235-71.
54. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. *Nature*, 2007. **450**: p. 903.
55. <http://www.ganzimmun.de/diagnostik/fachbereiche/immunologie/>, Zugriff: 19.11.2017
56. Strayer, D.R., W.A. Carter, and I. Brodsky, *Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity*. *Breast Cancer Res Treat*, 1986. **7**(3): p. 187-92.
57. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. *Lancet*, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.
58. Krasnova, Y., et al., *Bench to bedside: NK cells and control of metastasis*. *Clin Immunol*, 2017. **177**: p. 50-59.
59. Bidwell, B.N., et al., *Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape*. *Nature medicine*, 2012. **18**(8): p. 1224-1231.
60. Chin, A.I., et al., *Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance*. *Cancer Res*, 2010. **70**(7): p. 2595-603.
61. Mamessier, E., et al., *Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity*. *The Journal of clinical investigation*, 2011. **121**(9): p. 3609-3622.
62. Lanier, L.L., *NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(6): p. 575-82.
63. Crane, C.A., et al., *Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(35): p. 12823-8.

64. J. Diel, I., et al., *Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow at Primary Surgery: Prognostic Value in Comparison With Nodal Status*. Vol. 88. 1996. p.1652-1658
65. Kasimir-Bauer, S., et al., *Different prognostic value of circulating and disseminated tumor cells in primary breast cancer: Influence of bisphosphonate intake?* Sci Rep, 2016. **6**: p. 26355.
66. Bauer, K.R., et al., *Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype*. Cancer, 2007. **109**(9): p. 1721-1728.
67. Fehm, T., et al., *Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells*. Breast Cancer Research, 2009. **11**(4): p. R59.
68. Gomis, R.R. and S. Gawrzak, *Tumor cell dormancy*. Molecular Oncology, 2017. **11**(1): p. 62-78.
69. Massague, J. and A.C. Obenauf, *Metastatic colonization by circulating tumour cells*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 298-306.
70. Naumov, G.N., et al., *Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy?* Seminars in Cancer Biology, 2001. **11**(4): p. 271-276.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. Harald Seeger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Ines Gruber, Betreuerin.

Die Laborverfahren zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sowie zirkulierenden Tumorzellen im Blut wurden von Frau Amann und weiteren Labormitarbeiterinnen der Immunzytologie der Frauenklinik durchgeführt. Die Probenvorbereitung zur Durchführung der Analyse der Lymphozytensubpopulationen im Knochenmark und im Blut wurden von den Labormitarbeiterinnen Frau Amman, Frau Bruckner und Frau Teufel vorbereitet. Die anschließenden Messungen wurden mittels der Software Cell Quest Pro® von Frau Amann und weiteren Labormitarbeitern durchgeführt und hinterlegt und anschließend durch mich mit der Software Cell Quest Pro® analysiert.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Prof. Dr. Andreas Hartkopf durch mich.

Ich versichere das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau PD Dr. Ines Gruber verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Der Material- und Methodenteil wurde mit Frau Dr. Julia Böttge diskutiert und von mir verfasst.

Filderstadt, 26.09.2019

Nermien Amr

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen Personen bedanken, die zur Entstehung dieser Dissertationsschrift beigetragen haben

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Seeger sowie PD Frau Dr. Ines Gruber für die Auswahl des Themas und die stetige Unterstützung.

Hierbei möchte ich mich ganz besonders bei PD Frau Dr. Ines Gruber für das Einbringen inspirierender Gedanken und die intensive Betreuung bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Julia Böttge für die Einführung und Betreuung zu Beginn der Datenerfassung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Hartkopf für die statistische Beratung und Unterstützung herzlichst bedanken.

Ganz besonders möchte ich Frau Amann für ihre Einarbeitung in die Labortätigkeiten und ihre intensive Betreuung bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für Ihre Unterstützung danken.