

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Karl-Walter Jauch

**MHC Klasse I Expression auf Tumorzellen im Knochenmark von
Patientinnen mit Brustkarzinom und dessen Einfluss auf die
Überlebenszeit**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Said Ahmad Zia

aus

Kabul

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Professor Dr. med. Dr. h. c. K. W. Jauch

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. H. Bartels

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Professor Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17/04/2008

Dankaussagung

Michaele Rolle für die Hilfe im Labor

Dr. Helmut Exener für die statistischen Auswertung

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1-4
Materialien	4-7
Methoden	7-11
Ergebnisse	11-12
Diskussion	13-17
Zusammenfassung	18-19
Anhang	19-29
Literaturverzeichnis	30-37

Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase Anti- Alkalische Phosphatase
h	Stunden
HLA	Human Leukocyten Antigen
ITC	Isolierte Tumorzellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minuten
RT	Raumtemperatur

Einleitung

Brustkrebs ist der am häufigsten auftretende bösartige Tumor bei Frauen, an dem schätzungsweise 47.500 Frauen jedes Jahr aufs Neue in Deutschland erkranken. Im Durchschnitt erkrankt jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an dieser Krebsart, wobei das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, sich mit zunehmendem Alter erhöht. Im Jahr 2003 verstarben laut Statistik für Todesursachen 17.173 Frauen in Deutschland an Brustkrebs, der damit in der Krebssterblichkeit mit 18% den ersten Rang bei den Frauen belegt [www.krebsregister.saarland.de]. Die Prävalenz ist seit 1945 gestiegen und die Mortalität trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten nicht gesunken, sondern auf dem gleichen Niveau geblieben (27 Todesfälle per 100.000 Frauen) [Marchall et al. 1993].

Der Früherkennung durch Vorsorgeuntersuchungen von Frauen, die keine Symptome aufweisen, wird eine große Bedeutung für die Therapie und Bekämpfung des Brustkrebses beigemessen. Wichtig ist es aber auch festzustellen, wie fortgeschritten ein bösartiger Tumor ist, um den Patientinnen die richtige Therapie zukommen zu lassen. Dabei ist das Vorhandensein bzw. Fehlen von Metastasen ein entscheidender Faktor in der Wahl der Brustkrebstherapie und der Prognose [Pantel et al. 1993]. Brustkrebs metastasiert bevorzugt in das Knochenmark. Theoretisch sind nur wenige Tumorzellen nötig, um die Entwicklung von soliden Metastasen zu begünstigen. Das Problem besteht allerdings darin, dass mit herkömmlichen Untersuchungstechniken wie dem Knochenmarkszintigramm einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellaggregate nicht nachgewiesen werden können [Redding et al. 1983].

Für einige Krebsarten hat sich der Nachweis von isolierten Tumorzellen („isolated tumor cells“, ITC) im Knochenmark als besonders geeignet erwiesen, um eine prognostische Aussage für die betroffenen Patienten zu treffen. Allerdings sind epitheliale Zellen im Knochenmark mit routinemäßig durchgeführten histologischen Färbungen nach Pappenheim oder Giemsa nicht nachweisbar [Pantel et al. 1996 (b)]. Dennoch eignet sich das Knochenmark sehr gut als Nachweisort für Tumorzellen epithelialen Ursprungs, da diese sich in ihrem Zytokeratinmuster von den Stromazellen und den hämatologischen Stamm- und Vorläuferzellen unterscheiden [Kirk et al. 1990]. Der Nachweis von ITC im

Knochenmark durch immunhistologische Färbung gelang zum ersten Mal Solan et al. [Solan et al. 1980]. Inzwischen sind epitheliale Zellen im Knochenmark bei verschiedenen Karzinomen nachgewiesen worden [Schlimmock et al. 1987 und Funke et al. 1998]. Dabei hat die Untersuchungsmethode Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, mit der ITC nachgewiesen werden können. Die durchschnittliche Häufigkeit des Nachweises, d.h. die Wiederfindungsrate von ITC in verschiedenen Knochenmarkspräparaten desselben Patienten, liegt bei 35% [Funke et al. 1998].

Eine wichtige Frage ist, ob das Vorkommen von ITC mit etablierten klinischen Parametern, wie dem TNM-Stadium oder dem UICC-Stadium (International Union Against Cancer) korreliert, und ob eine Aussage bezüglich der Rezidivzeit und der Überlebenszeit getroffen werden kann. Einige Studien, die unter diesem Aspekt durchgeführt wurden, haben eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von ITC im Knochenmark und einer schlechteren Prognose für diese Patienten gefunden [Pantel et al. 1996 (a) und Braun et al. 2000].

Auf Grund der Häufigkeit des Mammkarzinoms verwundert es nicht, dass das Vorkommen von ITC besonders häufig bei diesem Tumor untersucht wurde [Funke et al. 1998]. Für Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko ist die Früherkennung von Metastasen sehr entscheidend, da diese Patientinnen eventuell von einer aggressiveren Therapie profitieren können. Der Knochenmarkstatus wird deswegen als ein wichtiger diagnostischer Parameter bei der Therapiewahl und der Nachsorge des Mammkarzinoms berücksichtigt. So wird in der TNM Klassifikation der Knochenmarkstatus als ein fakultativer Prognosefaktor M_(i) verwendet [Hermanek et al. 1993 und 1999]. Allerdings haben nicht alle Patientinnen, bei denen ITC im Knochenmark nachgewiesen wurden, auch ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv und entwickeln manifeste Metastasen [Funke et al. 1996]. Veränderungen der Antigen Expression bei Brustkrebs können bewirken, daß eine Subpopulation von Zellen die Entwicklung von Metastasen begünstigt.

Die Expression von Marker-Proteinen in ITC im Knochenmark wurde für verschiedene Tumorarten untersucht. Beispiele solcher Marker-Proteine sind die nukleären Proliferationsmarker ki 67 und p120 sowie das erbB2 Onkogen bei Brustkrebs [Pantel et al. 1993], das Zelladhäsions-Molekül CD54 beim Lungenkarzinom [Passlick et al. 1996], das MHC Klasse I Protein bei Brustkrebs und beim Kolonkarzinom [Pantel et al.

1991], sowie der Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) in Magenkarzinom [Heiss et al. 1995].

Unter den genannten Veränderungen des Proteinexpressionsmusters spielt der Major Histocompatibility Komplex (MHC) der Klasse I eine wichtige Rolle. Der MHC Klasse I Protein-Komplex ist ein polymorphes Transmembran-Glykoprotein, das von einem Gen auf dem Chromosom 6 kodiert wird. Das Protein ist assoziiert mit dem beta-2-Microglobulin Protein, dessen Gen auf dem Chromosom 15 lokalisiert ist. Der MHC Klasse I Komplex besteht aus dem klassischen (A,B,C) und dem nicht-klassischen System (E,F,G) (Ref). Er dient der Aktivierung von Immunzellen und spielt eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr bei der Erkennung und Vernichtung von Tumorzellen [Hicklin et al. 1999 und Ress et al. 1999]. So ist die Wirkung von zytotoxischen T-Zellen (CD 8+) von der Interaktion mit dem MHC Klasse I Komplex abhängig. Bei dieser Interaktion darf jedoch eine bestimmte Konzentration von MHC Klasse I Molekülen nicht unterschritten werden, damit der zytotoxische Effekt wirksam wird [Sykulev et al. 1996 und Moretta et al. 1997]. Ob der MHC Klasse I Komplex die gleiche Wirkung auf natürliche Killerzellen wie auf zytotoxische T-Zellen hat, wird kontrovers diskutiert [Hicklin et al. 1999 und Pazmany et al. 1996].

In der vorliegenden Studie wurde die Expression des MHC Klasse I Proteins auf ITC im Knochenmark von Patientinnen mit Brustkrebs untersucht. Für diese Studie wurden Daten von Knochenmarkuntersuchungen von Patientinnen verwendet, bei denen als Primärtherapie eine operative Entfernung des Tumors durchgeführt wurde. Patientinnen, die vor der Operation eine Chemotherapie oder Bestrahlungstherapie bekommen hatten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Studie wurde unter der Hypothese durchgeführt, dass Tumorzellen, die den MHC Klasse I Komplex nicht exprimieren, ein größeres malignes Potential aufweisen. Dies würde bedeuten, dass das Immunsystem nicht in der Lage ist, ITC mit einem MHC Klasse I negativen Phänotyp zu erkennen.

In dieser Studie wird zum ersten Mal der Einfluss der Expression des MHC Klasse I Komplexes auf die ITC im Knochenmark im Hinblick auf die Auswirkungen auf die Überlebens- und die rezidivfreie Zeit untersucht. Unsere Ergebnisse unterstützen die

Hypothese, dass Tumorzellen mit Verlust des MHC Klasse I Proteins ein größeres malignes Potential aufweisen.

Materialien

Lösungen und Puffer

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS); pH 7.4; 10 fach konzentriert:

80 g NaCl (Fluka)

14.2 g Na₂HPO₄ (Merck)

2 g KH₂PO₄ (Sigma)

2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck)

gelöst in 1 Liter dH₂O

Erythrozytenlysepuffer:

8.3 g NH₄Cl (Merck)

1 g KHCO₃ (Merck)

0.0372 EDTA Triplex III (Merck)

gelöst in 1 Liter; mit 5N KOH (Merck); auf pH 7.4 eingestellt

0.2 M Trislösung:

24.2 g Tris (Merck)

gelöst in 1 Liter dH₂O; mit 2M HCl (Merck) auf gewünschte pH einstellen

10% Humanserum (Biotest)

5% Mausserum (Biotest)

Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase; APAAP [160µ/ml] (Dakoptts)

Alkalische Phosphatase Konjugiertes Streptavidin (Dianova)

Aceton (Merck)

2% Glutaraldehyd (Merck)

Aufarbeitung der Knochenmarksaspirate

Ficoll (Pharmacia)

Trypanblau (Serva)

Immunohistochemische Färbung

Folgende Antikörper wurden bei der Einfach- und Doppelfärbung verwendet

Name	Target	Isotyp	Firma	Konzentration
CK2	Cytokeratin	Primär - Antikörper, Ig G	Boehringer Mannheim	2.5µg/ml
W6/32	MHC Klasse A,B,C	Primär- Antikörper, Ig G	Dianova	4µg/ml
MOPC 21	Isotyp Kontrolle	Ig G	Sigma	2.5µg/ml
R&M	Kaninchen- Anti-Maus	Sekundär- Antikörper, Ig M	Dakopattes,	20µg/ml
G&M	Ziege-Anti- Maus	Sekundär-	Amersham	20µg/ml

Neufuchsinfärbung, 5%

Lösung A: 72 mg Levamisol (Sigma) in 50 ml 0.2 M Tris-HCl Puffer (Merk), pH 9.7.lösen

Lösung B: 40 mg Natriumnitrit (Fluka) in 1 mL dH₂O lösen. 0.4 ml 5% Neufuchsin (Fluka) 5 g in 100 ml 2N HCl lösen.

Lösung C: 100 mg Naphthol AS BI Phosphat (Sigma), 1.2 ml N,N-Dimethylformamid (DMF; Fluka).

Immunogoldfärbung

Intense TM Silver Enhancement Kit (Amersham). Reagenz A und B.

Zelllinien

Tumorzellen: SKRB-3 Brustkarzinom (American Type Culture Collection, Manassas, VA)

Patientengut

In dieser Arbeit wurden 265 Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Das Patientengut besteht aus zwei Kollektiven, bei denen jeweils eine Untersuchung des Knochenmarks durchgeführt wurde. Kollektiv 1 bestand aus 180 Patientinnen und wurde in dem Zeitraum vom 1.10.1996 bis zum 31.12.1997 von mir untersucht. Kollektiv 2 enthielt 85 Patientinnen, es wurde vor dem 1.10.1996 untersucht und ebenfalls in die statistische Auswertung einbezogen. Vor der Operation wurde bei allen Patientinnen ein Tumorstaging gemäß der TNM und UICC Klassifikation durchgeführt [Sobin et al. 1997], um manifeste Metastasen auszuschließen. Es umfasste eine Mammographie, Röntgenaufnahmen des Thorax, Skelettszintigraphie, Oberbauchsonographie, CEA und eine CA-153 Bestimmung. Außerdem wurde der Menstruationsstatus erfasst [Santoro et al. 2004].

Statistische Analyse

Alle Kalkulationen wurden mit SAS (Version 6.08) TS Software (SAS Institute, Cary, NY) ermittelt.

Methoden

Aufarbeitung der Knochenmarksaspirate

Die Knochenmarkaspirate wurden intraoperativ mittels Plastikspritzen, die mit Heparin benetzt waren, aus beiden Spinae iliacae anteriores superiores gewonnen. Das Probevolumen schwankte zwischen 3 und 10 ml. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte innerhalb von 36 Stunden. Die Präparate wurden mit 50 ml PBS verdünnt und bei Raumtemperatur und 1200 rpm sieben Minuten lang zentrifugiert. Die flottierenden Bestandteile wurden abgenommen, das Sediment in 25 ml PBS resuspendiert und unter sorgfältiger Erhaltung der Phase auf 20 ml Ficoll geschichtet.

Das Trennen der Zellen erfolgte bei 2000 rpm für 20 Minuten bei 4° Celsius. Durch zweimaliges Zentrifugieren (1200 rpm; 7 Minuten, Raumtemperatur) mit PBS in 50 ml wurden die in der Interphase angereicherten Zellen gewaschen. Durch Zugabe von 1-3 ml Erythrozytenlysepuffer für 1 Minute nach dem ersten Waschvorgang wurde die Interphase von Erythrozyten gereinigt.

Nach Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau wurde die Anzahl der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. 1×10^6 Zellen auf einem Objektträger aufgebracht wurden. Die Objektträger wurden 12-24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und dann entweder gefärbt oder bei -20 Grad C gelagert.

Immunhistochemische Färbung

Einfachfärbung

Nach Fixierung in Aceton für 7 Minuten wurden die Präparate in PBS, die 10% Humanserum enthielt, inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptoren zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primär-Antikörper anti-CK2 für eine Stunde inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper, Kaninchen-Anti-Maus, beschichtet. Danach wurde der APAAP Komplex (Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) aufgebracht [Cordell et al. 1984]. Die Entwicklung erfolgte mit 5% Neufuchsin. Für jede Patientin wurden 1×10^6 Knochenmarkzellen gefärbt. SKRB-3 Zellen einer Mammakarzinom Zelllinie wurden als Positivkontrolle verwendet, der monoklonale Antikörper MOPC 21 (Mouse Myeloma Protein) diente als Isotypkontrolle.

Arbeitsprotokoll

1. Acetonfixierung	7 min
2. Trocknen	10 min
3. 10% Humanserum in PBS	20 min
4. Inkubation mit primärem Antikörper (anti-CK2)	60 min
5. Waschen mit PBS	3 x 5 min
6. Inkubation mit sekundärem Antikörper (Kaninchen -anti-Maus)	30 min
7. Waschen mit PBS	3 x 5 min
8. APAAP Inkubation	30 min
9. Waschen mit PBS	3 x 5 min
10. Entwicklung mit 5% Neufuchsin	30 min

Doppelfärbung

Zur Untersuchung der MHC Klasse I Antigen Expression wurde eine Kombination von APAAP und Immunogold Doppelfärbung durchgeführt [Riesenberg et al. 1993]. Die Präparate wurden wie oben angegeben für 10 Minuten in Aceton fixiert und mit 10% Humanserum in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte zunächst die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 gegen das MHC Klasse I Antigen, danach mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus. Bevor die Inkubation mit dem zweiten Primär-Antikörper (biotiniertem CK2), erfolgte, wurden die Präparate mit 5% Mausserum beschichtet. Es folgte eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin. Die Präparate wurden anschließend in 2% Glutaraldehyd fixiert und mit 5% Neufuchsin gefärbt. Für die Entwicklung der Immunogold Reaktion wurde das Intense TM Silver Enhancement Kit verwendet. Als Isotyp Kontrolle wurde die MOPC 21 Antikörper verwendet. SKBR-3 Zellen wurden als Positivkontrolle benutzt.

Arbeitsprotokoll

1. Acetonfixierung	7 min
2. Trocknen	10 min
3. Inkubation mit 10% Humanserum in PBS	20 min
4. Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper W6/32	60 min
5. Waschen mit PBS	3 x 5 min
6. Inkubation mit dem sekundären Antikörper Ziege-Anti-Maus	30 min
7. 5% Maus-Serum	3 x 5 min
8. Inkubation mit biotiniliertem CK2	60 min
9. Waschen mit PBS	3 x 5 min
10. Inkubation mit alkaliner Phosphatase konjugiertem Streptavidin	30 min
11. Waschen mit PBS	3 x 5 min
12. Fixierung in 2% Glutaraldehyd	10 min
13. Waschen mit PBS	3 x 5 min
14. Entwicklung mit 5% Neufuchsin	20 min

15. Waschen mit 1X PBS	3 x 5 min
16. Entwicklung der Immunogold Reaktion	50 min
17. Waschen mit dH ₂ O	3 x 5 min

Neufuchsinfärbung, 5%

Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und dann Lösung C zugegeben. Die Lösung wurde steril filtriert. Die Objektträger wurden für 20 min in diese Lösung getaucht und unter ständiger leichter Bewegung in einer Standkuvette bei Raumtemperatur gefärbt.

Immunogoldfärbung

Reagenz A (1.5 ml) und B (1.5 ml) wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Objektträger aufgetragen. Die Reaktion wurde mit dH₂O gestoppt.

Auswertung

Die Präparate wurden von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Bestanden Unstimmigkeiten bei der Auswertung wurde eine dritte Person hinzugezogen

Statistische Analyse

Die statistische Analyse für den prognostischen Einfluß des MHC Klasse I Phänotyps auf Tumorzellen im Knochenmark war auf Patientinnen ohne Fernmetastasen (M0) und eine therapierbare Resektion (R0) beschränkt (n=30). Der Pearson Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um die Korrelation zwischen MHC Klasse I Phänotyp und konventionellen klinischen Parametern zu testen. Der gleiche Test wurde für die Nachsorgestudie verwendet. Die Überlebensanalyse wurde mit der Kaplan-Meier-Methode ermittelt. Die

Methode basiert auf dem Log Rank Test; ein p-value < 0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Ergebnisse

Bei 265 Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurde während der Operation eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Das Knochenmark wurde auf das Vorkommen von isolierten epithelialen Tumorzellen (ITC) untersucht. Dazu wurde der monoklonale anti-Cytokeratin 18-Antikörper CK2 verwendet. Bei 99 von 265 Patientinnen (37.5%) wurden ITC gefunden (Abb. 1). Das Knochenmark dieser 99 Patientinnen wurde daraufhin untersucht, ob die ITC MHC Klasse I exprimieren. Dazu wurde eine Doppelfärbung durchgeführt, bei der die monoklonalen Antikörper CK2 und W6/32, letzterer gegen das MHC-A, B und C Antigen gerichtet, verwendet wurden. In diesen doppelt gefärbten Ausstrichen war die Wiederfindungsrate 35%, d. h. bei 35 dieser 99 Patientinnen wurden ITC gefunden, die CK 2 immunoreaktiv waren und in 22 Fällen MHC Klasse I exprimierten (Fig. 1). Für jede dieser Patientinnen wurden 1×10^6 Knochenmarkzellen gefärbt.

Da sich die vorliegende Untersuchung auf den prognostischen Einfluss der Expression von MHC Klasse I Proteinen auf ITC auf die Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit konzentriert, wurden 5 der 35 Patientinnen, die bereits zum Zeitpunkt der Operation solide Metastasen hatten, von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Die Patientinnen im Stadium R0 M0 (n=30) zeigten ein heterogenes Expressionsmuster von MHC Klasse I auf CK2+ Zellen (Tab. 1). Bei 16 Patientinnen (53.3%) waren alle ITC W6/32 positiv (CK2+//W6/32+ Phänotyp, Fig. 2a), bei 6 Patientinnen (20%) wurden W6/32 positive und W6/32 negative Zellen gefunden (CK2+//W6/32+ und - Phänotyp) und bei 8 Patientinnen (26,7%) waren W6/32 negativ (CK2+//W6/32- Phänotyp).

Um den Einfluss von MHC Klasse I Phänotypen auf klinische Faktoren und die Überlebenszeit zu untersuchen, wurden die Patientinnen 4 Gruppen zugeteilt und in einer statistischen Analyse miteinander verglichen (Tab. 2 und 3). Gruppe A beinhaltete Patientinnen, bei denen alle ITC CK2+//W6/32+ (n=16) waren, Gruppe B Patientinnen, bei denen alle ITC CK2+//W6/32- und bei denen sowohl CK2+//W6/32+ als auch

CK2+//W6/32- ITC vorkamen (n=14). Gruppe C enthielt nur Patientinnen, bei denen alle ITC CK2+//W6/32- waren (n=8) und Gruppe D Patientinnen, bei denen alle ITC CK2+//W6/32+ und bei denen sowohl CK2+//W6/32+ als auch CK2+//W6/32- ITC vorkamen (n=22). Folgende Gruppen wurden gegeneinander getestet: A gegen B und C gegen D. Es stellte sich heraus, dass der MHC Klasse I negative Phänotyp mit einem schlechter differenzierten Tumortyp (Grading 3) korreliert; (G1 vs. G3, p-value 0.036); gut differenziert (Grading 1). Im Gegensatz dazu stammten 93% der epithelialen Tumorzellen mit dem CK2+//W6/32+ Phänotyp (n=16) von Primärtumoren ab, die ein Grading von 1-2 aufwiesen. Alle anderen klinischen Parameter, wie das TNM Stadium, die UICC Klassifikation, das Alter der Patientinnen sowie ihr Menstruationsstatus wiesen keine statistisch signifikante Korrelation zum MHC Klasse I negativen Phänotyp auf.

Die Analyse der Überlebensdaten zeigte, daß 4 der R0 M0 Patientinnen innerhalb des Nachsorgezeitraums (Median 27 Monate, Range: 15-41 Monate) starben. Diese Patientinnen hatten alle W6/32- Tumorzellen im Knochenmark (CK2+//W6/32-, n=3; CK2+//W6/32+ und -, n=1).

Im Vergleich dazu waren alle Patientinnen des CK2+//W6/32 + Phänotyps am Ende des Nachsorgezeitraums noch am Leben (Gruppe A vs. B, p=0.02; Gruppe C vs. D, p=0.02, Tab. 2 und 3). Die Überlebensuntersuchung mit der Kaplan-Meier-Methode zeigt, daß der MHC Klasse I negative Phänotyp mit einer kürzeren Überlebenszeit korreliert, und daß Patientinnen mit MHC Klasse I positivem Phänotyp eine gute Überlebensprognose haben (Gruppe A vs. B, p=0.072; Gruppe C vs. Gruppe D, p=0.061, Fig. 3 und 4).

Diese Daten werden zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, daß 4 Patientinnen (R0 M0) der Gruppe A (CK2+//W6/32+) zwar mehr als zehn ITC im Knochenmarksausstrich (ca 10^6 Zellen) aufwiesen, aber keine Metastasen oder Rezidive entwickelten (Median der Nachsorgezeit, 87.5 Monate; siehe Fig. 5).

Weiterhin wurde der Effekt des Gradings (G) auf die Überlebenszeit untersucht (Fig. 6). Verglichen wurde G1-2 versus G3. Es stellte sich heraus, daß der Differenzierungsgrad des Primärtumors keinen Einfluß auf die Überlebenszeit der Patientinnen hatte. Bei der Betrachtung der Rezidivzeit in R0 M0 Patientinnen (n=29) wurde keine eindeutige Tendenz festgestellt. Möglicherweise ist hier eine längere Beobachtungszeit notwendig (Gruppe A vs. B p=0.08, Gruppe C vs. D p=0.6, Fig. 7 und 8).

Diskussion

Bis jetzt wurden verschiedene Prognosefaktoren, wie z.B. das Urokinase Plasminogen-Aktivator Protein, das Lektinbindungsmuster des Primärtumors, Ploidy, erbB2 Onkogen, Epidermal Growth Faktor, Cathepsin D und der Lymphknotenstatus, für den Brustkrebs diskutiert [Janicke et al. 1989, Leathem et al. 1987, Lee et al. 1990, Merkel et al. 1990, Neville et al. 1991, Paik et al. 1990, Sainsbury et al. 1987, Sigurdsson et al. 1990, Silverstrini et al. 1990, Tandon et al. 1990, Weidner et al. 1991]. Von diesen Faktoren hat der Lymphknotenstatus den besten Aussagewert bezüglich der Rezidiv- und Überberlebenszeit, wenn die einzelnen Prognosefaktoren gewichtet werden. [Jaenicke et al. 1994]. Mehrere Gruppen haben auch das Vorkommen von ITC im Knochenmark in verschiedenen Tumoren untersucht und mit klinischen und pathologischen Parametern korreliert [Redding et al. 1983, Salvadori et al. 1990, Dearnaley et al. 1991, Kirk et al. 1990, Cote et al. 1991, Mansi et al. 1991, Diel et al. 1992, Harbeck et al. 1994, Osborne et al. 1994]. Das Vorkommen von ITC im Knochenmark wurde beim Brustkrebs am besten untersucht. Es stellte sich daher die Frage, ob das Vorkommen von ITC im Knochenmark als Prognosefaktor des Mammakarzinoms benutzt werden kann und die Grundlage für eine Therapieentscheidung bilden kann [Izbicki et al. 2002, Pantel et al. 1999, 2000].

Funke et al. [Funle et al. 1998] gingen dieser Frage in einer Meta-Analyse nach und kamen zu dem Schluß, daß die Anzahl der Patientinnen in den untersuchten Gruppen sowie das methodische Vorgehen ein entscheidendes Kriterium dafür sind, welcher Status dem Knochenmarksbefund beigemessen werden kann. Weiterhin stellt sich die Frage, ob das Vorkommen von epithelialen Tumorzellen an sich die Entwicklung von soliden Metastasen begünstigt oder ob zusätzlich bestimmte Veränderungen der Protein-Expressionsmuster eine Rolle spielen [Pantel et al. 1994]. Änderungen in der genetischen Expression der Tumorzellen und die damit verbunden phänotypischen Änderungen könnten entscheidend für das Metastasierungsverhalten und die Bildung von soliden Metastasen sein [Frost et al. 1992, Hart et al. 1992]. Die Identifikation eines solchen

Phänotyps könnte damit eine wichtige prognostische und therapeutische Bedeutung erlangen. Obwohl bei einem großen Teil der Patientinnen das Mammakarzinom in einem frühen Tumorstadium (UICC: 0/I/II) diagnostiziert wird, entstehen trotz angemessener Therapie solide Metastasen oder lokale Rezidive. Um diesen Patientinnen bessere Therapiemöglichkeiten zukommen zu lassen, wären zusätzliche Marker wichtig, mit denen diese Patientinnen identifiziert werden können.

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von Metastasen ist die Möglichkeit der Tumorzellen, sich der Immunabwehr zu entziehen [Hicklin et al. 1999]. Bei der Erkennung und Vernichtung der Tumorzellen spielt das MHC Klasse I Antigen eine wichtige Rolle. Die CD 8+ T-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen (NK) erkennen und vernichten Tumorzellen über das MHC Klasse I Antigenexpressionsmuster [Heo et al. 1998, Rivoltini et al. 1995, Pende et al. 1998, Lanier et al. 1997, Lopez-Botet et al. 1999]. Der Verlust des MHC Klasse I Antigens könnte dazu führen, dass Tumorzellen von Immunzellen nicht erkannt werden. Diese Tumoren wären dadurch aggressiver, Metastasen könnten sich schneller entwickeln, so dass die Prognose für die Patientin sich verschlechtert [Gopas et al. 1989].

Die Expression des MHC Klasse I Antigens wurde in verschiedenen Tumoren untersucht, u.a. in Karzinomen der Lunge [Redondo et al. 1991, Passlick et al. 1994], der Niere [Luboldt et al. 1996], der Prostata [Blades et al. 1995], der Cervix uteri [Honma et al. 1994], der Brust [Maiorana et al. 1995, Concha et al. 1991 Vitale et al. 1998, Pantel et al. 1991], des Kolons [Moller et al. 1991 und Smith et al. 1988] des Kopf-Hals-Bereiches [Esteban et al. 1996, Mattijssen et al. 1991] sowie in Melanomen der Haut [Jager et al. 1997]. Bei diesen Untersuchungen konnte keine eindeutige Tendenz für eine schlechtere Prognose in Verbindung mit einem MHC Klasse I negativem Phänotyp der Tumorzellen gefunden werden. In der vorliegenden Studie wurde das Vorhandensein des MHC Klasse I Phänotyps auf ITC im Knochenmark mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers W6/32, der gegen das HLA- A,B,C Antigen gerichtet ist, in einer Gruppe von 30 Patientinnen, bei denen der Tumor vollständig entfernt wurde und die keine Metastasen aufwiesen (R0M0), bestimmt [Zia et al. 2001]. In fast der Hälfte der Patientinnen wurden ITC mit MHC Klasse I negativem Phänotyp im Knochenmark gefunden (46.7%), davon 8 Patientinnen (26.7%), in deren Knochenmark nur ITC mit MHC Klasse I negativem

Phänotyp beobachtet wurden und 6 Patientinnen (20%), die sowohl Tumorzellen mit MHC Klasse I negativem Phänotyp als auch positivem Phänotyp aufwiesen. Ein solches heterogenes Expressionsmuster wurde sowohl an ITC im Knochenmark [Bicknell et al. 1994] als auch bei Primärtumoren des Brustkrebses in anderen Studien beobachtet [Hicklin et al. 1999, Maiorana et al. 1995].

Die Korrelation des MHC Klasse I Expressionsmuster mit klinischen und pathologischen Parametern hat gezeigt, daß ITC im Knochenmark mit einem negativen MHC Klasse I Phänotyp sehr häufig von einem wenig differenzierten Brustkrebs stammen [Concha et al. 1991] und dass ein bei Primärkarzinomen gefundener negativer Phänotyp ebenfalls mit einem wenig differenzierten Tumor korreliert [Redondo et al. 1991, Vitale et al. 1998]. Der Vergleich zwischen Patientinnen, die ITC mit entweder MHC Klasse I positiven oder negativen Phänotypen aufwiesen, ergibt, dass 29% der Patientinnen (R0 M0) mit MHC Klasse I negativem Phänotyp innerhalb von 27 Monaten (Range 15-41 Monate) nach der Operation solide Metastasen entwickelten und starben, während alle Patientinnen mit MHC Klasse I positivem Phänotyp nach einer Nachsorgezeit von 98 Monaten (Range 15-98 Monate) noch am Leben waren. In dieser letzteren Gruppe befanden sich auch Patientinnen mit mehr als zehn ITC im Knochenmarksausstrich. Die positive Korrelation zwischen MHC Klasse I negativem Phänotyp und einer schlechteren Prognose für die Patientinnen wird weiter durch die Kaplan-Meier-Analyse unterstützt. Eine genauere Aussage kann aber erst nach der Untersuchung eines größeren R0 M0 Kollektivs, das die Anwendung einer Multivarianzanalyse erlaubt, getroffen werden.

Veränderungen im Expressionsmuster des MHC Klasse I Komplexes sind hauptsächlich auf zwei Ursachen zurückzuführen. Zum einen können Mutationen in den kodierenden Regionen der MHC Klasse I Gene auftreten, zum anderen führen Mutationen in den Regulationsregionen der Gene zu einer abnormalen Genexpression [Hicklin et al. 1999 (a)]. Zum Beispiel hat eine Mutation im β_2 -Microglobulin-Gen einen totalen Verlust des MHC Klasse I Komplexes zur Folge. Dies wurde bei Karzinomen der Lunge, des Kolons und der Brust sowie bei Melanomen beschrieben [Bicknell et al. 1994, Hicklin et al. 1997 (b), Hicklin et al. 1998, Chen et al. 1996]. Besonders sog. "hot spot" Regionen im β_2 -

Microglobulin Gen, die eine erhöhte Mutationsrate aufweisen, werden für den kompletten Verlust von MHC Klasse I Antigenen verantwortlich gemacht [Bicknell et al. 1994, Hicklin et al. 1997b, Hicklin et al. 1998]. Auch können Chromosomen-Aggregation (non-Dysjunction) und Rekombinationsereignisse in der Mitose zum Verlust der MHC Klasse I Gene führen [Marincola et al. 1994, Torres et al. 1996, Browning et al. 1993].

Mutationen, die sich auf den Transkriptionslevel des HLA B-Locus auswirken, beeinträchtigen die Expression des MHC Klasse I [Soong et al 1992]. Defekte im Antigen-Präsentationsprozess bewirken einen partiellen bis totalen Verlust des MHC Klasse I Antigens [Seliger et al. 1997, Peace-Brewer et al. 1996, Restifo et al. 1993]. Weiterhin sind bestimmte Onkogene wie z.B das c-myc und c-jun mit einer Herunterregulierung des MHC Klasse I Komplexes assoziiert [Versteeg et al. 1988, Howcroft et al. 1993].

Es stellt sich nun die Frage, ob Patientinnen, bei denen der primäre Tumor und /oder ITC einen MHC Klasse I negativen Phänotyp aufweisen, von einer Immuntherapie profitieren können. Für die Diskussion dieser Frage mögen folgende Studien von Bedeutung sein. In vitro Experimente haben gezeigt, dass die Transfektion von CD8+ Lymphozyten mit dem MHC Klasse I Gen mit einem höheren zytotoxischen Effekt der CD8+ Lymphozyten korreliert [Rivoltini et al. 1995]. Weitere Faktoren, die in vitro zur Hochregulierung von MHC Klasse I Molekülen benutzt wurden, sind Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor α [Rosenberg et al. 1990]. Klinische Studien haben ergeben, dass Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs, die mit allogenen Brustkrebszellen geimpft wurden, eine erhöhte Anzahl von CD8+ Zellen im Blut aufwiesen, diese aber nicht zu einer objektiven Tumorregression führten [Dols et al. 2003].

Diese Arbeit wurde 2001 abgeschlossen und die Ergebnisse im International Journal of Cancer publiziert [Zia et al. 2001]. Eines der Hauptprobleme in der ärztlichen Versorgung von Patientinnen mit Mammakarzinom ist immer noch, diesen eine adäquate Therapie zukommen zu lassen. Der Brustkrebs ist hinsichtlich seines Ursprungs ein sehr heterogener Tumor. Für die Prognose werden vor allem der Lymphknotenstatus und das Grading herangezogen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass beide Parameter das klinische Verhalten von Tumoren nicht zuverlässig beschreiben [Vant't Veer et al. 2002,

Goldhirsch et al. 1998 und National Institute of Health 2001]. Die Therapiewahl bei der Behandlung des Brustkrebses beruht bisher vor allem auf dem Lymphknotenstatus. Obwohl eine aggressive Behandlung mit Chemo- und Hormontherapie das Risiko von Fernmetastasen um ein Drittel reduziert, würden 70-80% dieser Patientinnen aber auch ohne diese Therapie überleben [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998, Perou et al. 1999]. Andererseits entwickeln Patientinnen Fernmetastasen, die auf Grund des Lymphknotenstatus und Gradings eine gute Prognose haben.

Diese Studie zeigt, daß ein Fehlen des MHC Klasse I Antigens auf ITC einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patientinnen hat [Zia et al. 2001]. Therapie-Ansätze, die zum Ziel haben die Expression des MHC Klasse I Proteins zu erhöhen, könnten bei der Behandlung von Brustkrebs und anderen Tumorarten Verwendung finden [Knuth et al. 2000, Mansi et al. 1999, Garrido et al. 1997]. Eine Studie von Weidanz et al. [Weidanz et al. 2006] zeigte, daß die Wirkung von cytotoxischen T-Lymphozyten vom Expressionsgrad des MHC Klasse I Proteinkomplexes abhängig ist.

Das MHC Klasse I Komplex präsentiert auf der Zelloberfläche von Tumorzellen tumor-spezifische Antigene („tumor-associated Ags“-TAA). Diese können vom Immunabwehrsystem erkannt werden. Viele Tumoren haben eine ganz spezifische TAA-MHC Klasse I Proteinkomplex. [Baxevanis et al. 2006, Andersen et al. 2003]. Diese Tatsache führte zur Entwicklung von einem Antikörper (Trastuzumab), welcher in der Behandlung von Brustkarzinom verwendet wird [Wittman et al. 2006].

Ist der Tumor in seinem genetischen Expressionsmuster soweit verändert, daß die Tumorzelle das MHC Klasse I Protein nicht mehr exprimiert, dann kann davon ausgegangen werden, daß diese Tumorzelle auch schlechter vom Immunsystem erkannt wird und somit viel aggressiver sein wird. Neue Technologien wie Proteomic Scanning Chips und DNA-Mikroarrays bieten die Möglichkeit die Protein und m-RNA Expression von MHC Klasse I Proteinkomplex im Brustkarzinom zu studieren [Rock et al. 2004] und neue Therapieansätze zu finden.

Zusammenfassung

Im Durchschnitt erkrankt jede 11. Frau an Brustkrebs [www.krebsregister.saarland.de], der bevorzugt in das Knochenmark metastasiert. Theoretisch sind nur wenige Tumorzellen nötig, um die Entwicklung von soliden Metastasen zu begünstigen. Allerdings können mit herkömmlichen Untersuchungstechniken wie dem Knochenmarkszintigramm einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellaggregate nicht nachgewiesen werden [Redding et al. 1983]. Das Knochenmark eignet sich sehr gut als Nachweisort für Tumorzellen epithelialen Ursprungs, da diese sich in ihrem Zytokeratinmuster von den hämatologischen Stamm- und Vorläuferzellen unterscheiden [Kirk et al. 1990]. Eine wichtige Frage ist, ob das Vorkommen von ITC an sich mit etablierten klinischen Parametern korreliert oder andere Veränderungen am Proteinexpressionsmuster entscheidend sind. In dieser Studie wird zum ersten Mal der Einfluss der Expression des MHC Klasse I Komplexes auf die ITC im Knochenmark im Hinblick auf die Auswirkungen auf die Überlebens- und die rezidivfreie Zeit untersucht. Bei der Erkennung und Vernichtung der Tumorzellen spielt das MHC Klasse I Antigen eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Studie wurde das Vorhandensein des MHC Klasse I Phänotyps auf ITC im Knochenmark mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers W6/32, der gegen das HLA- A,B,C Antigen gerichtet ist, in einer Gruppe von 30 Patientinnen, bei denen der Tumor vollständig entfernt wurde und die keine Metastasen aufwiesen (R0M0), bestimmt [Zia et al. 2001]. Die Überlebensuntersuchung mit der Kaplan-Meier-Methode zeigt, daß der MHC Klasse I negative Phänotyp mit einer kürzeren Überlebenszeit korreliert, und daß Patientinnen mit MHC Klasse I positivem Phänotyp eine gute Überlebensprognose haben ($p=0.02$, Tab. 2 und 3). Diese Daten werden zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, daß 4 Patientinnen (R0 M0) zwar mehr als zehn MHC Klasse I positive ITC im Knochenmarksausstrich (ca 10^6 Zellen) aufwiesen, aber keine Metastasen oder Rezidive entwickelten (Median der Nachsorgezeit, 87.5 Monate; siehe Fig. 5).

Ist der Tumor in seinem genetischen Expressionsmuster soweit verändert, daß die Tumorzelle das MHC Klasse I Protein nicht mehr exprimiert, dann ist diese Tumorzelle auch schlechter vom Immunsystem erkennbar. Unsere Ergebnisse unterstützen die

Hypothese, daß Tumorzellen mit Verlust des MHC Klasse I Proteins ein größeres malignes Potential aufweisen.

Anhang

Tabelle 1

Patientin ¹	W6/32- ²	W6/32+ ²	Gesamtzahl	Einzelne Zellen	Zellcluster
235		10	10	10	1x2, 1x3, 1x4, 3x10
1025		14	14	5	3x10
965		31	31	1	
594		40	40	10	
244		3	3	3	
2995		1	1	1	
2750		2	2	2	
2766		2	2	2	
2777		1	1	1	
2793		2	2	2	
234		4	4	2	2x1
304		1	1	1	
1047		3	3	3	
2993		1	1	1	
2816		1	1	1	
2996		1	1	1	
1594	2		2	2	
2991	1		1	1	
1212	9		9	1	1x2, 1x6
2827	1		1	1	
1278	2		2	2	
1259	1		1	1	
1437	1		1	1	
396	11		11	3	2x4
2896 ³	22	1	23	12	W6/32-: 1x3, 4x2
595 ³	8	20	28	W6/32-: 1 W6/32+ 20	W6/32-: 1x3 1x4
432 ³	5	45	50	W6/32-: 5 W6/32+: 3	W6/32+: 1x2, 1x5, 1x10, 1x15
2667 ³	3	1	4	W6/32-: 3 W6/32+: 1	
230 ³	8	12	20	W6/32-: 8 W6/32+: 2	W6/32+: 1x2, 1x8
398 ³	2	3	5	W6/32-: 2 W6/32+: 1	W6/32+: 1x2

Eine Zusammenfassung aller R0 M0 Patientinnen, die in der statistischen Erhebung einbezogen wurden;

¹ bei der Erfassung der Daten hat jede Patientin eine Nummer bekommen, um die Erfassung der Daten zu erleichtern

² MHC Klasse I Phänotyp

³ bei diesen Patientinnen wurden im Knochenmark Tumorzellen sowohl mit MHC Klasse I negativem Phänotyp und positivem Phänotyp gefunden.

Tabelle 2

Parameter	n	Gruppe A	Gruppe B	p*
Alter (Median)	30			
< 56		8	8	
> 56		8	6	n.s.
T Stage	30			
Tis/T1/T2		14	13	
T3/T4		2	1	n.s.
N Stage	30			
Positive		10	6	
Negative		6	8	n.s.
Grading [#]	29			
G1		2	3	
G2		12	5	
G3		1	6	0.036
UICC [#]	29			
0/I/II		13	12	
III/IV		2	2	n.s.
Menostatus	30			
Pre		7	3	
Post		9	11	n.s.
Überleben	30			
Tod		0	4	
am Leben		16	10	0.02
Rezidiv [#]	29			
Ja		3	5	
Nein		12	9	n.s.

Korrelation zwischen MHC Klasse I Phänotyp auf epithelialen Zellen im Knochenmark mit klinopathologischen Parametern in R0M0 Patientinnen. Gruppe A: CK2+//W6/32+ (n=16); Gruppe B: CK2+//W6/32- und CK2+//W6/32+ und - (n=14); n = Anzahl von Patientinnen; n.s. nicht signifikant; [#] Daten nicht für alle Patientinnen vorhanden, *Signifikant mit Pearson chi-square Test $p < 0.05$

Tabelle 3

Parameter	n	Gruppe C	Gruppe	p*
Alter (Median)	30			
< 56		4	12	
> 56		4	10	n.s.
T Stage	30			
Tis/T1/T2		8	19	
T3/T4		0	3	n.s.
N Stage	30			
Positive		4	12	
Negative		4	10	n.s.
Grading [#]	29			
G1		2	3	
G2		2	15	
G3		1	3	0.061
UICC [#]	29			
0/I/II		7	18	
III/IV		1	3	n.s.
Menostatus	30			
Pre		1	9	
Post		7	13	n.s.
Überleben	30			
Tod		3	1	
am Leben		5	21	0.02
Rezidiv [#]	29			
Ja		3	5	
Nein		5	16	n.s.

Korrelation zwischen MHC Klasse I Phänotyp auf epithelialen Zellen im Knochenmark mit klinopathologischen Parametern in R0 M0 Patientinnen. Gruppe C: CK2+//W6/32- (n=8); Gruppe D: (CK2+//W6/32+ und CK2+//W6/32+ und - (n=22); n = Anzahl von Patientinnen; n.s. nicht signifikant; [#] Daten nicht für alle Patientinnen vorhanden, *Signifikant mit Pearson chi-square Test p < 0.05

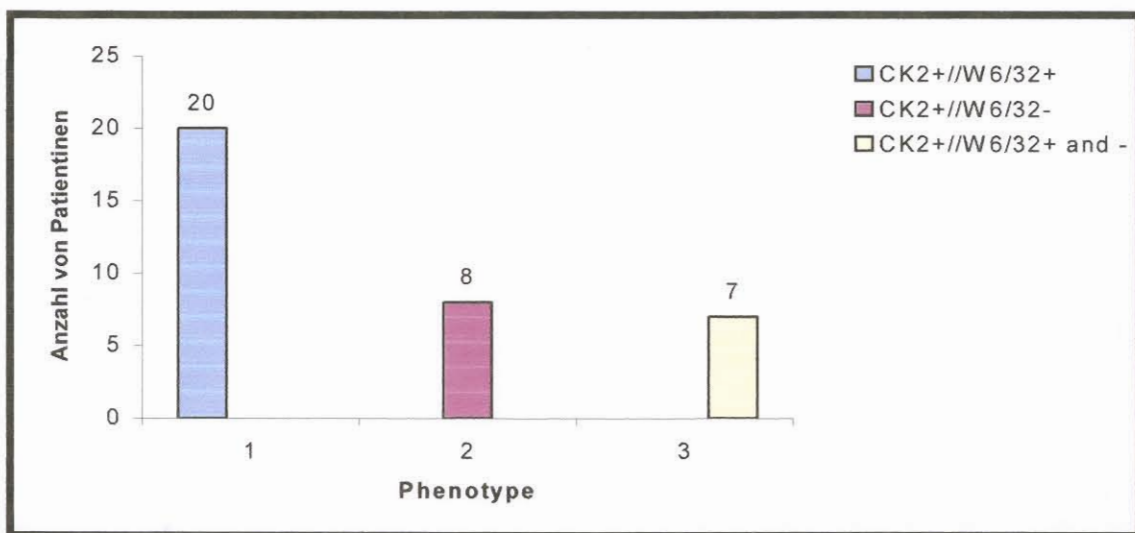
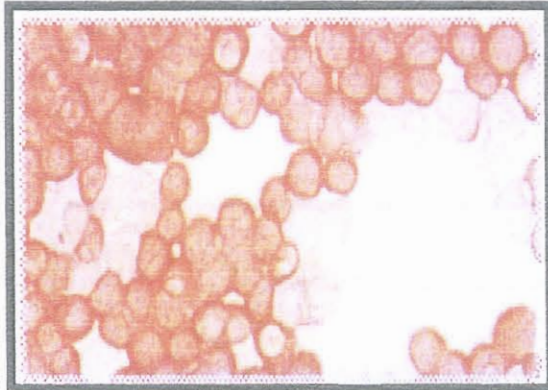


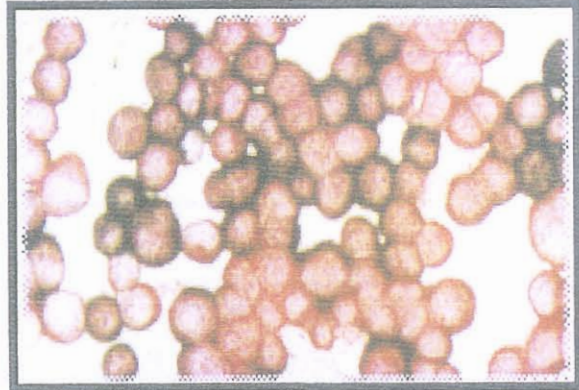
Fig. 1 Die Phänotypische Charakterisierung der Knochenmark Präparate nach der Doppelfärbung zur Identifizierung des MHC Klasse I Expression. Von den 35 Patientinnen hatten fünf solide Metastasen (M1) zum Zeitpunkt der Operation.

I



CK2+ Kontrolle

II



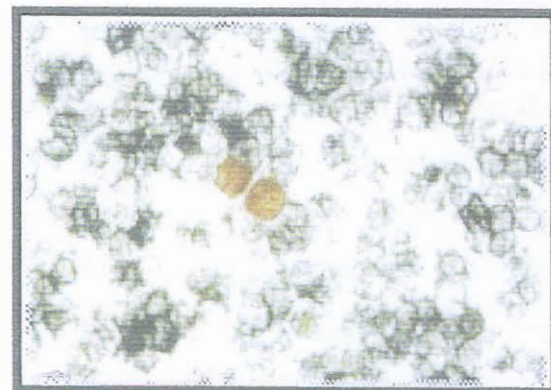
CK2+//W6/32+ Kontrolle

III



W6/32+ Kontrolle

IV



CK2+//W6/32+ Tumorzellen

V



CK2+//W6/32- Tumorzellen

Fig. 2 Färbungen von Tumorzellen. Abb. I-III zeigen SKRB-3 Tumorzelllinien des Brustkarzinoms, die als Kontrolle benutzt wurden. Abb. IV-V zeigen Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom. Rot gefärbte Zellen stellen Tumorzellen dar, die positiv für das Antikörper CK2 waren, gerichtet gegen das Cytokeratin 18. Die schwarze Färbung stellt die Expression des MHC Klasse I Proteins dar. Hierbei wurde der Antikörper W6/32 zur Färbung benutzt.

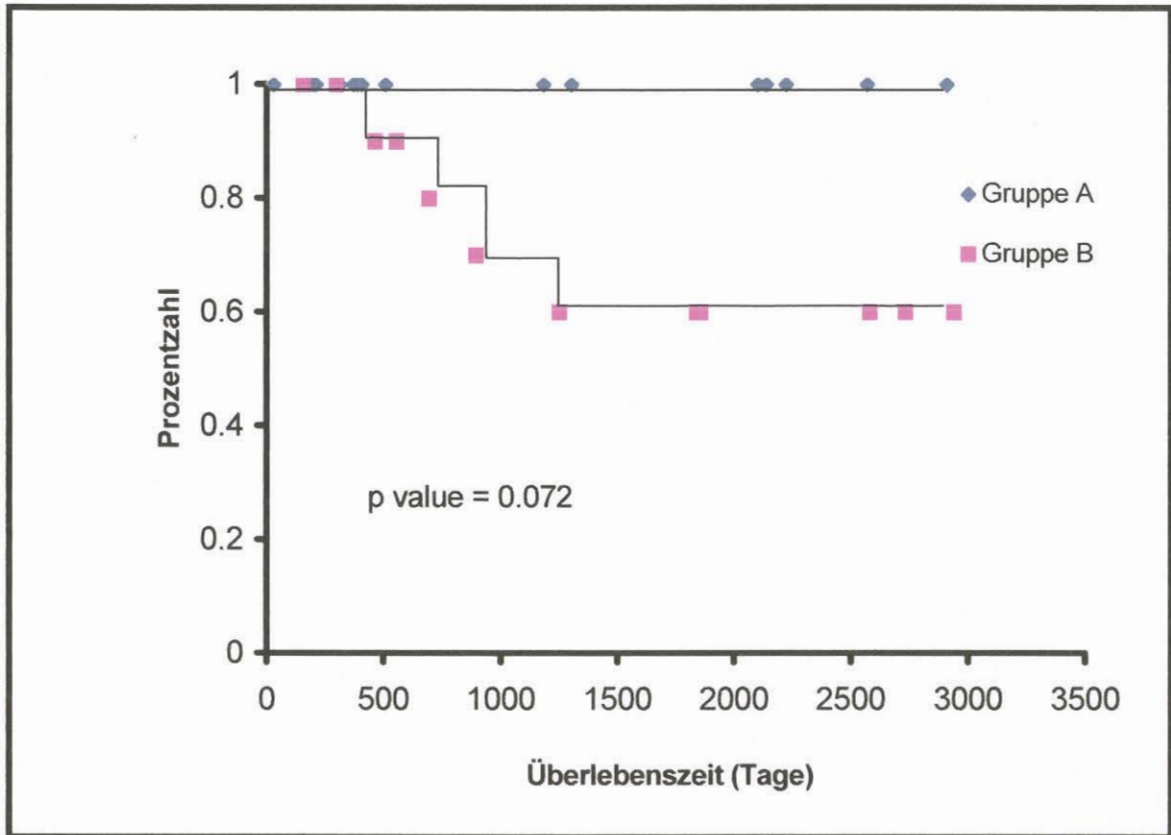


Fig. 3 Die Kaplan-Meier Überlebenskurven für R0 M0 Patientinnen mit Mammakarzinom sind unterteilt gemäß des MHC Klasse I (mAb W6/32) Phänotyps der epithelialen Zellen (mAb CK2) im Knochenmark. Gruppe A: CK2+//W6/32+ (n=16); Gruppe B: CK2+// W6/32-, CK2+//W6/32+ und - (n=14). Aufgetragen ist die Überlebenszeit in Tagen gegen die Prozentzahl überlebender Patientinnen (log rank p = 0.072).

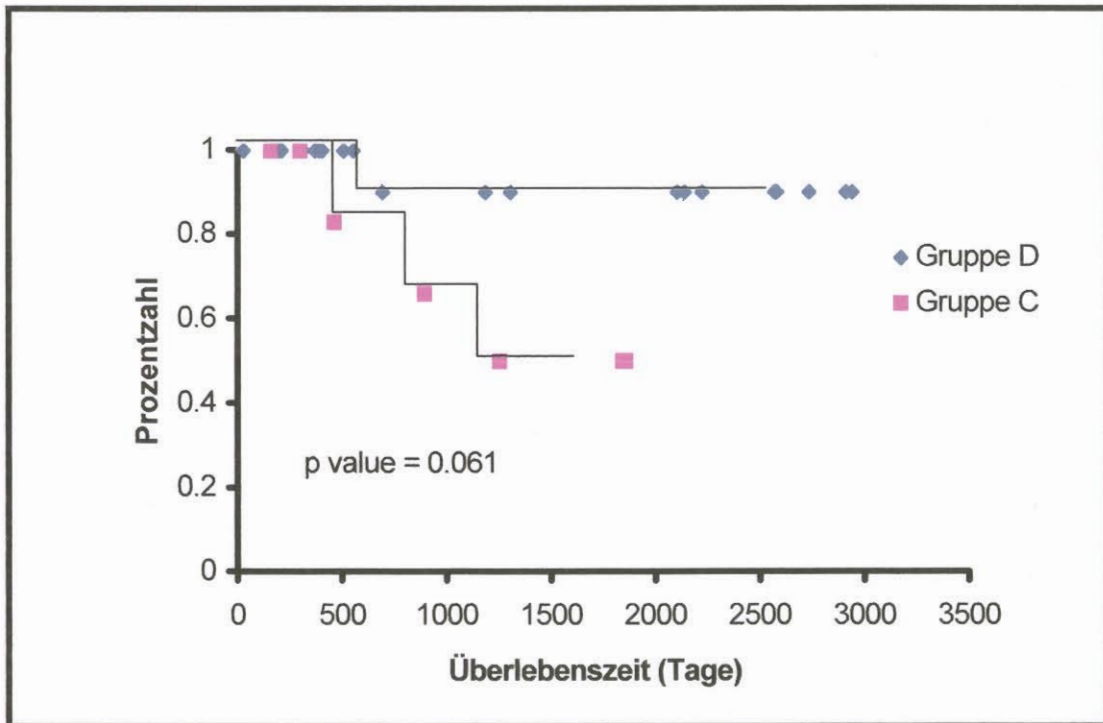


Fig . 4 Die Kaplan Meier Überlebenskurven für R0 M0 Patientinnen mit Mammakarzinom sind unterteilt gemäß des MHC Klasse I (mAb W6/32) Phänotyps der epithelialen Zellen (mAb CK2) im Knochenmark. Gruppe C: CK2+//W6/32- (n=8); Gruppe D: CK2+// W6/32+, CK2+//W6/32+ und - (n=22). Aufgetragen ist die Überlebenszeit in Tagen gegen die Prozentzahl der überlebender Patientinnen (log rank $p = 0.061$).

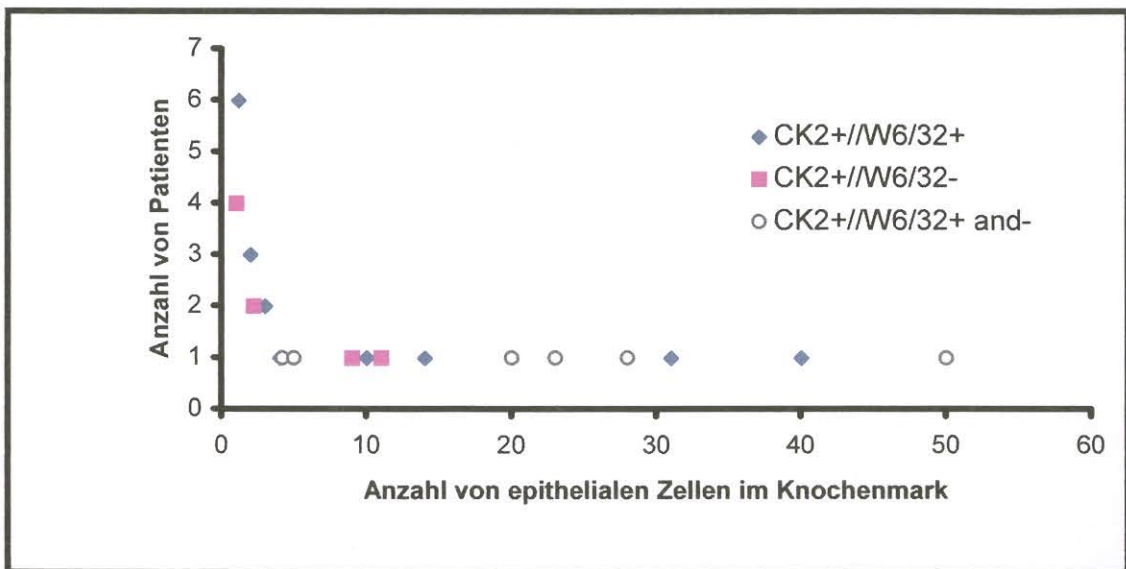


Fig. 5 MHC Klasse I Phänotyp und Anzahl von epithelialen Tumorzellen im Knochenmark von R0 M0 Patientinnen (n=30). CK2+//W6/32+ (n=16), CK2+//W6/32- (n=8) und CK2+//W6/32+ und - (n=6).

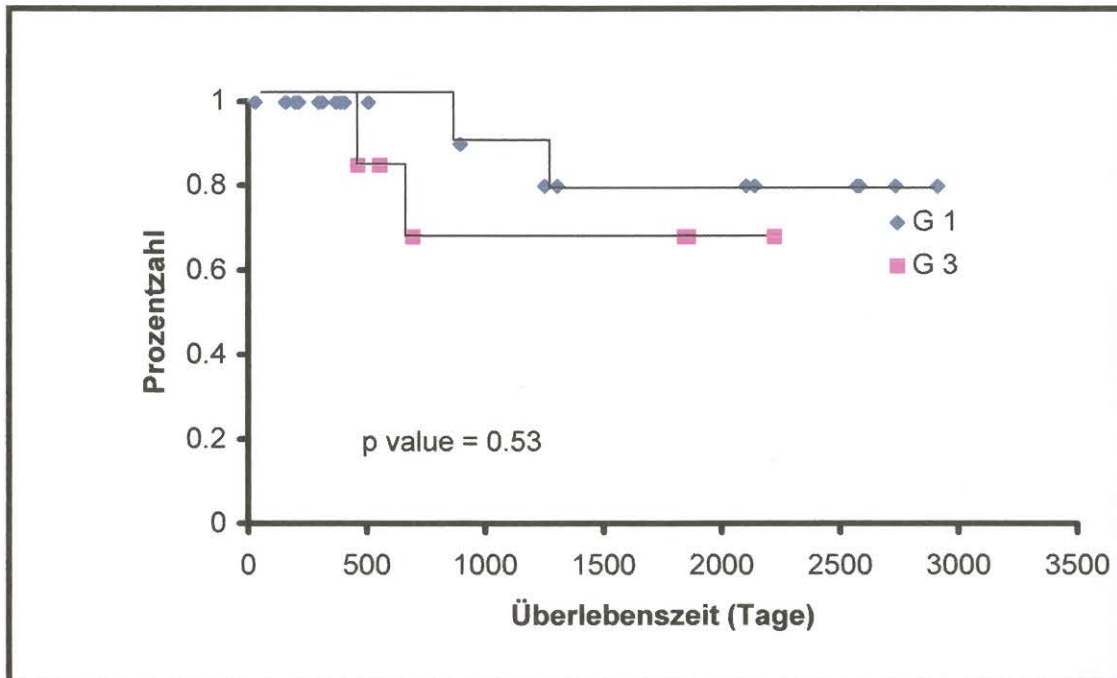


Fig .6 Kaplan Meier Überlebenskurven mit dem Einfluss des Differenzierungsgrades (Grading) des Tumors auf die Überlebenszeit in R0 M0 Patientinnen (n=29) mit Mammakarzinom, die epithelialen Zellen im Knochenmark hatten und bei denen der MHC Klasse I Phänotyp (mAb W6/32) bestimmt worden war.

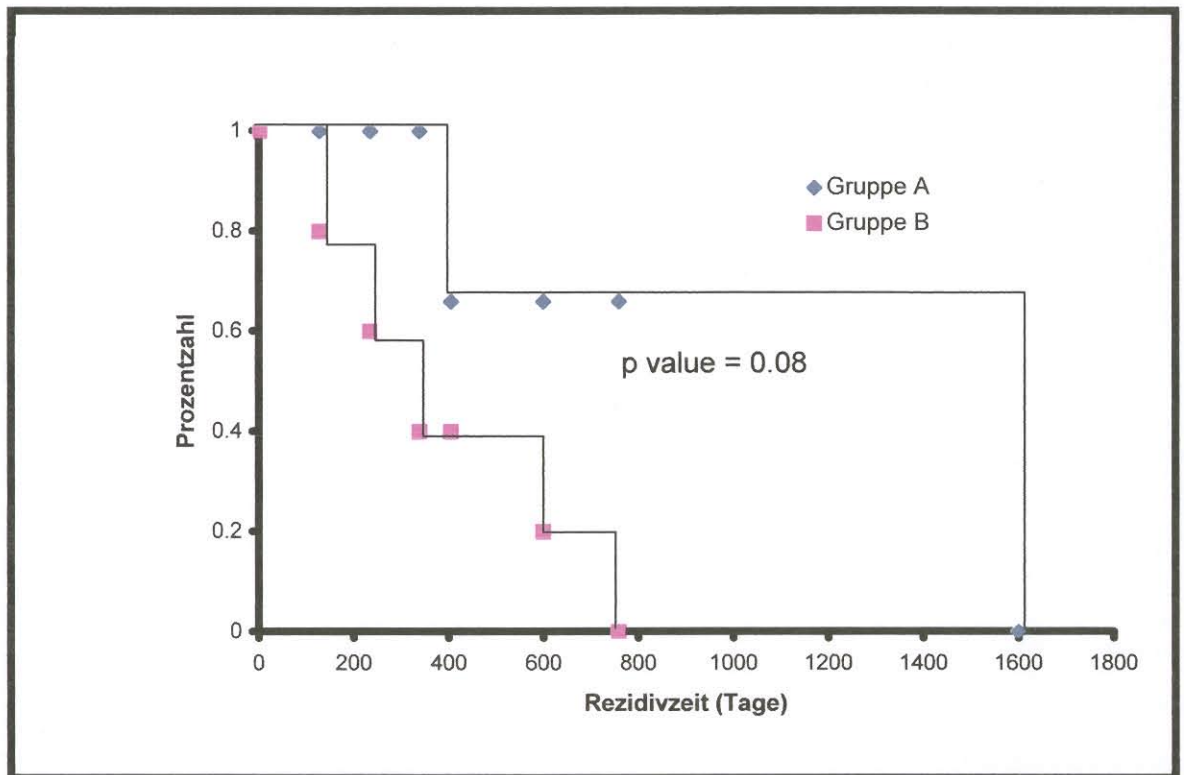


Fig .7 Der MHC Klasse I Phänotyp (m Ab W6/32) epithelialer Zellen im Knochenmark und dessen Einfluss auf die Rezidivzeit von R0 M0 Patientinnen (n=29) mit Mammakarzinom. Gruppe A: CK2+//W6/32+, (n=15); Gruppe B: CK2+//W6/32-, CK2+//W6/32+ und - (n=14)

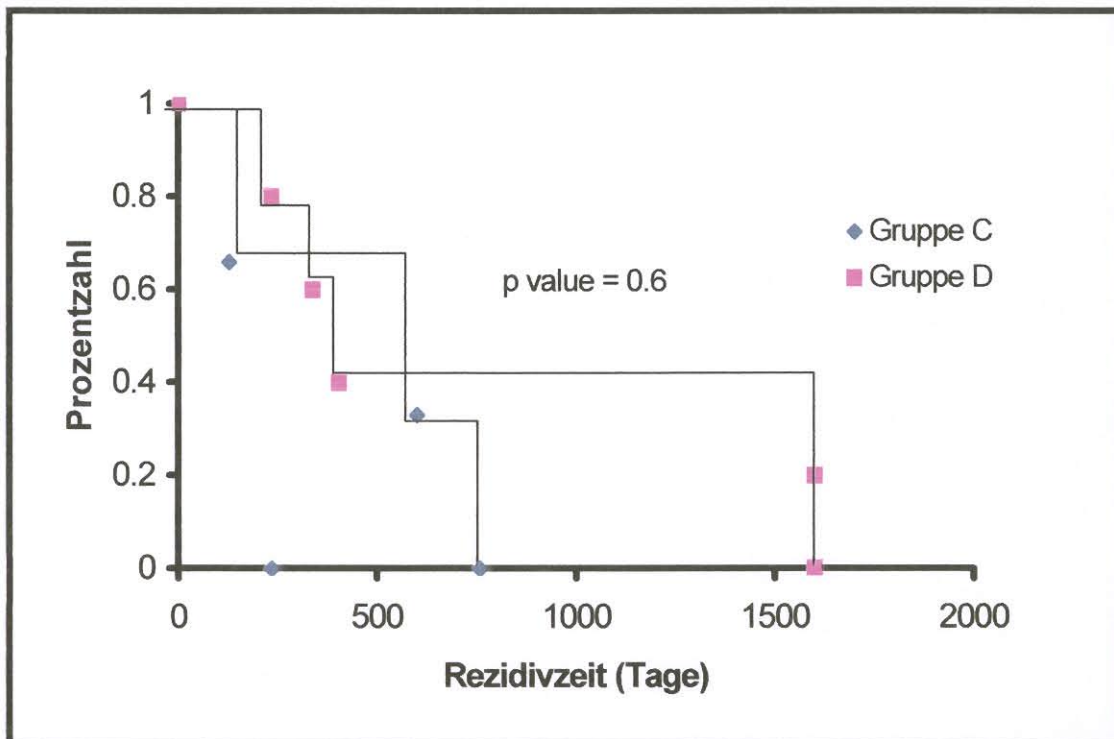


Fig. 8 Der MHC Klasse I Phänotyp (m Ab W6/32) epithelialer Zellen im Knochenmark und dessen Einfluss auf die Rezidivzeit von R0 M0 Patientinnen (n=29) mit Mammakarzinom. Gruppe C: CK2+//W6/32-, (n=8); Gruppe D: CK2+//W6/32+, CK2+//W6/32+ und - (n=21).

Literaturverzeichnis

- M. L. ANDERSEN, M. RUHWALD, M. THORN, A. E. PEDERSEN, S. MATHIASSEN, S. BUUS, M. H. CLAESSEON (2003) Tumorassociated antigens identified by mRNA expression profiling as tumor rejection epitopes, *J. Immune Based Ther. Vaccines* 1:1
- C. N. BAXEVANIS, N. N. SOTIRIADOU, A. D. GRITZAPIS, P. A. SOTIROPOULOU, S. A. PEREZ, N. T. CACOULLOS, M. PAPAMICHAIL (2006) Immunogenic HER-2/new peptides as tumor vaccines, *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 85-95
- D.C. BICKNELL, A. ROWAN, W.F. BODMER (1994) Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4751-6
- R.A. BLADES, P.J. KEATING, L.J. MCWILLIAM, N.J. GOERGE, P.L. STERN (1995) Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implication for immunotherapy, *Urology* 46: 681-6
- S. BRAUN, K. PANTEL, P. MUELLER, W. JANNI, F. HEPP, C. KENTENICH, S. GASTROPH, A. WISCHNIK, T. DIMPFL, G. KINDERMANN, G. RIETHMULLER, G. SCHLIMOK (2000) Cytokeratin-positive cells in bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 342: 525-33
- M.J. BROWNING, P. KRAUSA, A. ROWAN, D.C. BICKNELL, J.G. BODMER, W.F. BODMER (1993) Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2842-5
- H.L. CHEN, D. GABRILOVICH, A. VIRMANI, I. RATNANI, K.R. GIRGIS, S. NADAF-RAHROV, M. FERNANDFZ-VINA, D.P. CARBONE (1996) Structural and functional analysis of beta2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer, *Int. J. Cancer* 67: 756-63
- A. CONCHA, T. CABRERA, F.RUIZ-CABELLO, F. GARRIDO (1991) Can the HLA phenotype be used as a prognostic factor in breast cancer? *Int. J. Cancer* S6: 146-54
- J.L. CORDELL, B. FALINI, W.N. ERBER, A.K. GHOSH, Z. ABDULAZIZ, S. MACDONALD, K.A. PULFORD, H. STEIN, D.Y. MASON (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphates and monoclonal antialkaline phosphates (APAAP complexes), *J. Histochem. Cytochem.* 32: 219-29
- R.J. COTE, P.P. ROSEN, M.L. LESSER, L.J. OLD, M.P. OSBORNE (1991) Predication of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases, *J. Clin. Oncol.* 9: 1749-56
- D.P. DEARNALEY, M.G. ORMEROD, J.P. SLOANE (1991) Micrometastases in breast cancer: long-term follow-up of the first patient cohort, *Eur. J. Cancer* 27: 236-9
- I.J. DIEL, M. KAUFMANN, R. GOERNER, S.D. COSTA, S. KAUL, G. BASTERT (1992) Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary

- breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis, *J. Clin. Oncol.* 10: 1534-9
- A. DOLS, J.W. SMITH 2ND, S.L. MEIJER, B.A. FOX, H.M. HU, E. WALKER, S. ROSENHEIM, T. MOUDGIL, T. DORAN, W. WOOD, M. SELIGMAN, W.G. ALVORD, D. SCHOOF, W.J. URBA (2003) Vaccination of women with metastatic breast cancer, using a costimulatory gene (CD80)-modified, HLA-A2-matched, allogeneic, breast cancer cell line: clinical and immunological results, *Hum. Gene Ther.* 14: 1117-23
- EARLY BREAST CANCER TRIALIST'S COLLABORATIVE GROUP (1998) Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials, *Lancet* 352: 930-42
- F. ESTEBAN, M. REDONDO, M. DELGADO, F. GARRIDO, F. RUIZ-CABELLO (1996) MHC class I antigens and tumour-infiltrating leucocytes in laryngeal cancer: long-term follow-up, *Br. J. Cancer* 74: 1801-4
- P. FROST, B. LEVIN (1992) Clinical implications of metastatic process, *Lancet* 339 (8807): 1458-61
- I. FUNKE, S. FIRES, M. ROLLE, MM. HEISS, H. BOHMERT, F.W. SCHILDBERG, K.W. JAUCH (1996) Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer, *Int. J. Cancer* 65: 755-61
- I. FUNKE, W. SCHRAUT (1998) Meta-analysis of bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated, *J. Clin. Oncol.* 16: 557-66
- F. GARRIDO, F. RUIZ-CABELLO, T. CABRERA, J.J. PEREZ-VILLAR, M. LOPEZ-BOTET, M. DUGGAN-KEEN, P.L. STERN (1997) Implications for Immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors, *Immunol. Today* 18; 89-95
- A. GOLDBIRSCH, J.H. GLIK, R.D. GELBER, H.J. SENN (1998) Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1601-8
- J. GOPAS, B. RAGER-ZISMAN, M. BAR-ELI, G. J. HAMMERLING, S. SEGAL (1989) The relationship between MHC antigen expression and metastasis, *Adv. Cancer Res.* 53: 89-115
- N. HARBECK, M. UNTCH, L. PACHE, W. EIERMANN (1994) Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3 year median follow-up, *Br. J. Cancer* 69: 566-71
- J.R. HART, A. SAINI (1992) Biology of tumor metastasis, *Lancet* 339 (8807): 1453-7
- D.S HEO, S.J. YOON, W.S. KIM, K.H. LEE, J.G. SEOL, S.G. LEE, C.W. JUNG, E.K. CHO, C.W. KIM, M.H. PARK. M.W. SUNG, K.H. KIM, Y.J. BANG, N.K. KIM (1998) Locoregional response and increased natural killer activity after intratumoral injection of HLA/ beta2-microglobulin gene in patients with cancer, *Hum. Gen. Ther.* 9: 2031-8
- P. HERMANEK, D.E. HENSON, R.V. REUTTER, L.H. SOBIN (1993) TNM supplement 1993 Berlin, Germany: Springer
- P. HERMANEK, R.V. HEUTER, L.H. SOBIN, C. WITTEKIND (1999) International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and Micrometastasis, *Cancer* 86: 2668-73

- M.M. HEISS, H. ALLGAYER, K.U. GRUETZNER, I. FUNKE, R. BABIC, K.W. JAUCH, F.W. SCHILDBERG (1995) Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumor cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer, *Nat. Med.* 1: 1035-9
- D.J. HICKLIN, D.V. DELLARATTE, R. KISHORE, B. LIANG, T. KAGESHITA, S. FERRONE (1997) Beta2-microglobulin gene mutation in human melanomas cells: molecular characterization and implications for immune surveillance, *Melanoma Res.* S2: 67-74 (b)
- D.J. HICKLIN, F.M. MARINCOLA, S. FERRONE (1999) HLA class I down-regulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story, *Mol. Med. Today* 5: 178-86 (a)
- D.J. HICKLIN, Z. WANG, F. ARIENTI, L. RIVOLTINI, G. PARMIANI, S. FERRONE (1998) Beta2-microglobulin mutations, HLA class I antigen loss and tumor progression in melanoma, *J. Clin. Invest.* 101: 2720-9 (c)
- S. HONMA, S. TSUKADA, S. HONDA, M. NAKAMURA, K. TAKAKUWA, T. MARUHASHI, S. KODAMA, K. KANAZAWA, T. TAKAHASHI, K. TANAKA (1994) Biological-clinical significance of selective loss of HLA class I allelic product expression in squamous-cell carcinoma of the uterine cervix, *Int. J. Cancer* 57: 650-5
- T.K. HOWCROFT, J.C. RICHARDSON, D.S. SINGER (1993) MHC class I gene expression is negatively regulated by the proto-oncogene, c-jun, *EMBO J.* 12: 3163-9
- J.R. IZBICKI, K. PANTEL, S.B. HOSCH (2002) Micrometastasis in solid epithelial tumors: impact on surgical oncology, *Surgery* 131: 1-5
- F. JAENICKE, U. JEHN (1994) Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom, *Tumorzentrum München, Empfehlungen zur Diagnostik und Nachsorge*, 5. Auflage: 37-45
- E. JAGER, M. RINGHOFFER, M. ALTMANNBERGER, M. ARAND, J. KARBACH, D. JAGER, F. OESCH, A. KNUTH (1997) Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma, *Int. J. Cancer* 71: 142-7
- F. JANICKE, M. SCHMITT, K. ULM, W. GOSSNER, H. GRAEFF (1989) Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer, *Lancet* 2 (8670): 1049
- S.J. KIRK, G.G. COOPER, M. HOPER, P.C. WATT, A.D. ROY, W. ODLING-SMEE (1990) The prognosis significance of marrow micrometastases in women with early breast cancer, *Eur. J. Surg. Oncol.* 16: 481-5
- A. KNUTH, D. JAGER, E. JAGER (2000) Cancer immunotherapy in clinical oncology, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46: S46-51
- KREBSREGISTER (2005) www.krebsregister.saarland.de
- L.L. LANIER, (1997) Natural killer cell receptors and MHC class I interactions, *Curr. Opin. Immunol.* 9: 126-31
- A.K. LEE, R.A. DELELLIS, M.L. SILVERMAN, G.J. HEATLEY, H.J. WOLFE (1990) Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast, *J. Clin. Oncol.* 8: 1457-65
- A.J. LEATHAM, S.A. BROOKS (1987) Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival, *Lancet* 1 (8541): 1054-6

- H.J. LUBOLDT, B.S. KUBENS, H. RUBBEN, H. GROSSE-WILDE (1996)
 Selective loss of human leukocyte antigen class I allele expression in advanced renal cell carcinoma, *Cancer Res.* 56: 826-30
- M. LOPEZ-BOTET, T. BELLON (1999) Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 301-7
- A. MAIORANA, A. M. CESINARO, R.A. FANO, G. COLLINA (1995)
 Expression of MHC class I and class II antigens in primary breast carcinomas and synchronous nodal metastases, *Clin. Exp. Metastasis* 13: 43-8
- J.L. MANSI, D. EASTON, U. BERGER, J.C. GAZET, H.T. FORD, D. DEARNALEY, R.C. COOMBES (1991) Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 year's follow-up, *Eur. J. Cancer* 27: 1552-5
- J.L. MANSI, H. GOGAS, J.M. BLISS, J.C. GAZET, U. BERGER, R.C. COOMBES (1999) Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study, *Lancet* 354: 197-202
- F.M. MARINCOLA, P. SHAMAMIAN, R.B. ALEXANDER, J.R. GNARRA, R.L. TURETSKAYA, S.A. NEDOSPASOV, T.B. SIMONIS, J.K. TAUBENBERGER, J. YANNELLI, A. MIXON (1994) Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines, *J. Immunol.* 153: 1225-37
- G.M. MARLEY, L.A. DOYLE, J.V. ORDONEZ, A. SISK, A. HUSSAIN, R. W. YEN (1989) Potentiation of interferon induction of Class I major histocompatibility complex antigen expression by human tumor necrosis factor in small cell lung cancer cell lines, *Cancer Res.* 49: 6232-6
- E. MARSHALL (1993) Epidemiology. Search for a killer: focus shifts from fat to hormones, *Science* 259: 618-21
- V. MATTIJSEN, P.H. DE MULDER, L. SCHALKWIJK, J.J. MANNI, B.V. VAN'T HOF-GROOTENBOER, D.J. RUITER (1991) HLA antigen expression in routinely processed head and neck squamous cell carcinoma primary lesions of different sites, *Int. J. Cancer* 56: 95-100
- D.E. MERKEL, W.L. MCGUIRE (1990) Ploidy, proliferative activity and Prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors, *Cancer* 65: 1194-205
- P. MOLLER, F. MOMBURG, K. KORETZ, G. MOLDENHAUER, C. HERFARTH, H.F. OTTO, G.J. HAMMERLING, P. SCHLAG (1991) Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma, *Cancer Res.* 51: 729-36
- A. MORETTA, R. BIASSONI, C. BOTTINO, D. PENDE, M. VITALE, A. POGGI, M.C. MINGARI, L. MORETTA (1997) Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and lymphocytes, *Immunol. Rev.* 155: 105-17
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL (2001) National institute of health consensus development conference statement: Adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000, *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 979-89
- A.M. NEVILLE (1991) Breast cancer micrometastases in lymph nodes and bone marrow are prognostically important, *Ann. Oncol.* 2: 13-4
- M.P. OSBORNE, P.P. ROSEN (1994) Detection and management of bone marrow

- micrometastases in breast cancer, *Oncology* (Huntingt). 8: 25-31
- S. PAIK, R. HARZAN, E.R. FISHER, R.E. SASS, B. FISHER, C. REDMOND, J. SCHLESSINGER, M.E. LIPPMAN, C.R. KING (1990) Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 8: 103-12
- K. PANTEL (1996) Detection of minimal disease in patients with solid tumors, *J. Hemathother.* 5: 359-67 (b)
- K. PANTEL, R.J. COTE, O. FODSTAD (1999) Detection and clinical importance of micrometastatic disease, *J. Natl. Cancer Int.* 91: 1113-24
- K. PANTEL, J. IZBICKI, B. PASSLICK, M. ANGSTWURM K. HAEUSSINGER, O. THETTER, G. RIETHMULLER (1996) Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small lung cancer without overt metastases, *Lancet* 347: 649-53 (a)
- K. PANTEL, M. VON KNEBEL DOBERITZ (2000) Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells, *Curr. Opin. Oncol.* 12: 95-101
- K. PANTEL, G. SCHLIMOK, M. ANGSTWURM, D. WECKERMANN, W. SCHMAUS, H. GATH, B. PASSLICK, J.R. IZBICKI, G. RIETHMULLER (1994) Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow, *J. Hematother.* 3: 165-73
- K. PANTEL, G. SCHLIMOCK, S. BRAUN, D. KUTTER, F. LINDEMANN, G. SCHALLER, I. FUNKE, J.R. IZBICKI, G. RIETHMULLER (1993) Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1419-24
- K. PANTEL, G. SCHLIMOCK, D. KUTTER, G. SCHALLER, T. GENZ, B. WIEBECKE, R. BACKMANN, I FUNKE, G. RIETHMULLER (1991) Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells, *Cancer Res.* 51: 4712-5
- B. PASSLICK, J.R. IZBICKI, S. SIMMEL, B. KUBUSCHOK, O. KARG, M. HABEKOST, O. THETTER, L. SCHWEIBERER, K. PANTEL (1994) Expression of major histocompatibility class I and II antigen and intercellular adhesion molecule-1 on operable non-small cell lung carcinomas: frequency and prognostic significance, *Eur. J. Cancer* 30: 376-81
- B. PASSLICK, K. PANTEL, B. KUBUSCHOK, M. ANGSTWURM, A. NEHER, O. THETTER, L. SCHWEIBERER, J.R. IZBICKI (1996) Expression of MHC molecules and ICAM on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumor cells, *Eur. J. Cancer* 32A: 141-5
- L. PAZMANY, O. MANDELBOIM, M. VALEZ-GOMEZ, D.M. DAVIS, H.T. REYBURN, J.L. STROMINGER (1996) Protection from natural killer cell mediated lysis by HLA-G expression on target cells, *Science* 274: 792-5
- A.L. PEACE-BREWER, L.G. TUSSEY, M. MATUSI, G. LI, D.G. QUINN, J.A. FRELINGER (1996) A point mutation in HLA-A*0201 results in failure to bind the TAP complex and to present virus-derived peptides to CTL, *Immunity* 4: 505-14
- D. PENDE, L. ACCAME, L. PARETI, A. MAZZOCCHI, A. MORETTA, G. PARMIANI, L. MORETTA (1998) The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles, *Eur. J. Immunol.* 28: 2384-94

- C.M. PEROU, S.S. JEFFREY, M. VAN DE RIJN, C.A. REES, M.B. EISEN, D.T. ROSS, A. PERGAMENSCHIKOV, C.F. WILLIAMS, S.X. ZHU, J.C. LEE, D. LASHKARI, D. SHALON, P.O. BROWN, D. BOTSTEIN (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9212-7
- H.W. REDDING, R.C. COOMBES, P. MONAGHAN, H.M. CLINK, S.F. IMRIE, D.P. DEARNALEY, M.G. ORMEROD, J.P. SLOANE, J.C. GAZET, T.J. POWLESS, A.M. NEVILLE (1983) Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer, *Lancet* 2 (8362): 1271-4
- M. REDONDO, A. CHONCHA, R. OLDIVIELA, A. CUETO, A. GONZALEZ, F. GARRIDO, F. RUIZ-CABELLO (1991) Expression of HLA class I and II antigen in bronchogenic carcinoma: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters, *Cancer Res.* 51: 4948-54
- R.C. REES, S. MIAN (1999) Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses, *Cancer Immunol. Immunother.* 48: 374-81
- N.P. RESTIFO, F. ESQUIVEL, Y. KAWAKAMI, J.W. YEWDELL, J.J. MULE, S.A. ROSENBERG, J.R. BENNINK (1993) Identification of human cancers deficient in antigen processing, *J. Exp. Med.* 177: 265-72
- R. RIESENBERG, R. OBERNEDER, M. KRIEGMAIR, M. EPP, U. BITZER, A. HOFSTETTER, S. BRAUN, G. RIETHMULLER, K. PANTEL (1993) Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells, *Histochemistry* 99: 61-6
- L. RIVOLTINI, K.C. BARRACCHINI, V. VIGGIANO, Y. KAWAKAMI, A. SMITH, A. MIXON, N.P. RESTIFO, S.L. TOPALIAN, T.B. SIMONIS, S.A. ROSENBERG, F.M. MARINCOLA (1995) Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes, *Cancer Res.* 55: 3149-57
- K. L. ROCK, I. A. YORK, A. L. GOLDBERG (2004) Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation, *Nat. Immunol.* 5: 670-77
- S.A. ROSENBERG, P. AEBERSOLD, K. CORNETTA, A. KASID, R.A. MORGAN, R. MOEN, E.M. KARSON, M.T. LOTZE, J.C. YANG, S.L. TOPALIAN, M.J. MERINO, K. CULVER, D. MILLER, M. BLAESE, F. ANDERSON (1990) Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction, *N. Engl. J. Med.* 323: 570-8
- J.R. SAINSBURY, J.R. FARNDON, G.K. NEEDHAM, A.J. MALCOLM, A.L. HARRIS (1987) Epidermal-growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer, *Lancet* 1 (8547): 1398-402
- N. SANTORO, J.L. CHERVENAK (2004) The menopause transition, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 33: 627-36
- B. SALVADORI, P. SQUICCIARINI, D. ROVINI, S. OREFICE, S. ANDREOLA, F. RILKE, L. BARLETTA, S. MENARD, M.I. COLNAGHI (1990) Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients, *Eur. J. Cancer* 26: 865-7

- G. SCHLIMOCK, I. FUNKE, B. HOLZMANN, H.G. GOTTLINGER, G. SCHMIDT, H. HAUSER, S. SWIERKOT, H.H. WARNECK, B. SCHNEIDER, H. KOPROWSKI, G. RIETHMULLER (1987) Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti 17-1A monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8672-76
- B. SELIGER, M.J. MAEURER, S. FERRONE (1997) TAP off -- Tumors on, *Immunol. Today* 18: 292-99
- H. SIGURDSSON, B. BALDETORP, A. BORG, M. DALBERG, M. FERNO, D. KILLANDER, H. OLSSON (1990) Indicators of prognosis in node-negative breast cancer, *New Engl. J. Med.* 322: 1045-53
- R. SILVERSTRINI, M.G. DAIDONE, P. VALAGUSSA, G. DIFRONZO, G. MEZZANTOTTE, L. MARIANI, G. BONADONNA (1990) 3H-thymidine-labeling index as a prognostic indicator in node-positive breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 8: 1321-6
- JP. SLOANE, M.G. ORMEROD, A.M. NEVILLE (1980) Potential application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases, *Cancer Res.* 40: 3079-82
- M.E. SMITH, W.F. BODMER, J.G. BODMER, (1988) Selective loss of HLA-A,B,C locus products in colorectal adenocarcinoma, *Lancet* 9 (8589): 823-4
- L.H. SOBIN, C.H. WITTEIND, UICC: TNM classification of malignant tumors (1997) 5th ed New York: Wiley-Liss
- T.W. SOONG, K.M. HUI (1992) Locus-specific transcriptional control of HLA genes, *J. Immunol.* 149: 2008-20
- Y. SYKULEV, M. JOO, I. VTURINA, T.J. TSOMIDES, H.N. EISEN, (1996) Evidence that a single peptide MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T-cell response, *Immunity* 4: 565-71
- A. K. TANDON, G.M. CLARK, G.C. CHAMNESS, J. M. CHIRGWIN, W.L. MCGUIRE (1990) Cathepsin D and prognosis in breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 322: 297-302
- M.J. TORRES, F. RUIZ-CABELLO, A. SKOUDY, G. BERROZPE, P. JIMENEZ, A. SERRANO, F.X. REAL, F. GARRIDO (1996) Loss of HLA haplotype in pancreas tissue and its corresponding tumor derived cell line, *Tissue Antigens* 47: 372-81
- L. J. VAN'T VEER, H. DAI, M.J. VAN DE VIJVER, Y.D. HE, A.A. HART, M. MAO, H.L. PETERSE, K. VAN DER KOOY, M.J. MORTON, A.T. WITTEVEEN, G.J. SCHREIBER, R.M. KERKHOVEN, C. ROBERTS, P.S. LINSLEY, R. BERNARDS, S.H. FRIEND (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature* 415: 530-6
- R. VERSTEEG, I.A. NOORDEMEER, M. KRUSE-WOLTERS, D.J. RUITER, P.I. SCHRIER (1988) c-myc down-regulates class I HLA expression in human Melanomas, *EMBO J.* 7: 1023-9
- M. VITALE, R. REZZANI, L. RODELLA, G. ZAULI, P. GRIGOLATO, M. CADEI, D.J. HICKLIN, S. FERRONE (1998) HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high grade primary breast carcinoma lesions, *Cancer Res.* 58: 737-42
- J. A. WEIDANZ, T. NGUYEN, T. WOODBURN, F.A. NEETHLING, M.

- CHIRIVA-INTERNATI, W. H. HILDEBRAND, J. LUSTGARTEN (2006) Levels of specific peptide-HLA class I complex predicts tumor cell susceptibility to CTL killing, *J. Immunol.* 177: 5088-97
- N. WEIDNER, J.P. SEMPLE, W.R. WELCH, J. FOLKAM (1991) Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 324: 1-8
- V. P. WITTMAN, D. WOODBURN, T. NGUYEN, F. A. NEETHLING, S. WRIGHT, J. A. WEIDANZ. (2006) Antibody targeting to a class I MHC-peptide epitope promotes tumor cell death, *J. Immunol.* 177: 4187-95
- A. ZIA, F.W. SCHILDBERG, I. FUNKE (2001) MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients, *Int. J. Cancer* 93: 566-70

Persönliche Information

Name	Ahmad Zia
Geburtsdatum	15 September 1972
Geburtsort	Kabul
Adresse	Max-Wönnner Strasse 32: c/o Faghani 80995 München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Ausbildung und Beruf

11/2007	<i>Wissenschaftlicher Mitarbeiter</i> , Ludwig-Maximilians Universität, Undergraduate Programm
07/2005-06/2007	<i>Klinische Genetik</i> (Fellowship) Morgan Stanley Children's Hospital Columbia University
07/2004-06/2005	<i>Kinderheilkunde</i> (Assistenzarzt) Schneider Children' Hospital, Albert Einstein College of Medicine
07/2003-06/2004	<i>Kinderheilkunde</i> (Assistenzarzt) Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania,
07/2002-06/2003	<i>Kinderheilkunde</i> (Assistenzarzt) Mercy Children's Hospital Medical College of Ohio
12/2000-05/2002	Postgraduierter Forschungsbeauftragter, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
04/1999-11/1999	<i>Medizin Studium</i> , Harvard Medical School
04/1994-05/2000	<i>Medizin Studium</i> , Ludwig-Maximilians-Universität

Akademische Erfahrung

07/2003-06/2004	<i>Instructor in Pediatrics</i> , University of Pennsylvania
04/1994-06/1998	<i>Assistent für Histologie und Anatomie Kurse</i> , Ludwig-Maximilians-Universität

Forschung

- 11/20006-04/2007 *Forschungsprojekt Klinische Genetik: New York University Medical Center, Neurogenetics. Mentor: Dr. Gregory Pastores, Newborn screening and the dilemma for screening programs in genetic counseling*
- 12/2000-05/2002 *HHMI Postdoctoral fellow in the Laboratory of Dr. Nouria Hernandez, Cold Spring Harbor Laboratory, Characterization of transcription factor BRFU (TFIII B)*
- 09/1998-03/1999 *Yale Child Health Research Center
Mentor: Dr. J.R Gruen, Genetic linkage and mapping*
- 10/1996-11/2000 *Doktorarbeit: Ludwig-Maximilians-Universität
Mentor: Prof. Helmut Bartels
MHC class I expression on disseminated tumor cells in bone marrow of breast cancer patients*

Publikationen

Papers

Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a pair of mildly affected monozygotic twin sister in their late 50's. **Ahmad Zia**, Edwin H. Kolodny, Gregory M Pastores, J. Inherit. Metab. Dis., May 2007

MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in ROM0 cancer patients. **Zia A**, Schildberg FW, Funke I. Int J. Cancer, 93, 566-70, 2001

Peaks of linkage are localized by a BAC/PAC contig of the 6p reading disability locus. J. Ahn, T.W. Won, **A. Zia**, H. Reutter, D.E. Kaplan, R. Sparks. J.R. Gruen, Genomics, 78, 19-29, 2001.

Abstracts

Very long chain acyl-CoA dehydrogenase-Mangel bei monozygoten Zwillingsschwwestern: versäumte Diagnose, verspätete therapeutische Intervention und das Dilemma der Beratung für Screeningprogramme. Gregory M Pastores, Edwin H. Kolodny, **Ahmad Zia**, 103. Jahrestagung der DGKJ, Nürnberg, 13. – 16. September 2007

Cloning the 6p reading disability locus. Workshop on reading disability: 25 year follow-up of the Orton families. Ahn J, Won TW, Kaplan D, **Zia A**, Reutter H, Gruen JR, Bowman Gray Medical Center, Wake Forest University, Winston-Salem, North Carolina, October 7, 1999

Construction of a 6 Mb bacterial clone contig in the reading disability region on 6p22. Ahn J, **Zia A**, Won T, Gruen JR. *A J Med Genet*, Supp, 65(4):A220, October 1999

Assembly of sequence ready bacs and pacs spanning D61950 through D6S1621 on 6p21.3-22. Ahn, **A. Zia**, T. Wong, J. Gruen. 4th chromosome 6 workshop, The Sanger Trust Center. Wellcome Trust Genome Campus, Hixton, Cambridge. June 10th-12th, 1999

Loss of MHC class I antigen on disseminated tumor cells in bone marrow of breast cancer patients has a strong impact to poor survival. **Zia A**, Schildberg F.W, Funke I. East Student Research Forum, Miami, February 25th-27th, 1999

Stipenden

04/1999-09/1999	<i>Harvard Medical School-Ludwig-Maximilians University-Program for Medical Education</i>
02/25 -02/27/1999	<i>UMMW award for the Advancement in Treatment of Women's Health, Miami. East Student Research Forum.</i>
09/1998-04/1999	<i>German Academic Exchange Program and Biomedical Sciences Exchange Program, Research Fellowship Medizinische Hochschule Hannover</i>
09/1996-05/2000	<i>Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung</i>