

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Regulatorische T-Zellen und Glukokortikoide

–

bei Gesunden und bei Nebennierenkarzinompatienten

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Thomas Dexneit

aus Würzburg

Würzburg, November 2014

Referent: Prof. Dr. med. M. Faßnacht-Capeller

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

21.07.2015

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern und
meinen lieben Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das menschliche Immunsystem und Tumore	1
1.1.1	B-Lymphozyten und Tumore	3
1.1.2	T-Lymphozyten und Tumore	4
1.1.2.1	CD3 und CD8 positive Zellen und Tumore	5
1.1.2.2	CD3 und CD4 positive Zellen und Tumore	7
1.1.2.2.1	Regulatorische T-Zellen und Tumore	9
1.1.3	Dendritische Zellen und Tumore	10
1.2	Glukokortikoide - deren physiologische und immunmodulatorische Wirkungen	12
1.3	Die Nebenniere – Ort der endogenen Steroidsynthese	13
1.4	Nebennierenrindentumore	15
1.4.1	Nebennierenrindenadenome	15
1.4.2	Das Nebennierenrindenzarzinom	16
1.4.2.1	Klinisches Bild und Prognose	16
1.4.2.2	Pathogenese des Nebennierenrindenzarzinoms	18
1.4.2.3	Therapieoptionen des Nebennierenrindenzarzinoms	19
2	Fragestellungen der Arbeit	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Untersuchung des peripheren Blutes auf regulatorische T-Zellen bei Patienten mit Nebennierenkarzinomen	23
3.2	Methodik	23
3.2.1	Gewinnung von Leukozyten	23
3.2.2	Ermittlung der Zellzahl	24
3.2.3	Oberflächenfärbung	25
3.2.4	Intrazelluläre Färbung	25
3.2.5	Durchflusszytometrie	27
3.2.6	Ermittlung der Absolutzahlen der Zellen	27
3.3	Immunhistologische Methoden	28
3.3.1	Herstellung der Paraffinschnitte	28
3.3.2	Färbung der Paraffinschnitte mit Antikörpern	28
3.3.3	Messung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	30
3.4	Die Wirkung von Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen bei Mäusen	30
3.4.1	Mauslinien und Versuchsaufbau	30
3.4.2	Gewinnung von Lymphozyten	31
3.4.3	Färbung der Zellen	32
3.4.4	Durchflusszytometrie	32

3.5 Untersuchung des peripheren Blutes auf regulatorische T-Zellen immunologisch gesunder Patienten unter Glukokortikoidstoßtherapie	32
3.6 Statistik	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Nebennierenkarzinom	35
4.2 Assoziation zwischen peripheren Regulatorischen T-Zellen und der Prognose beim Nebennierenkarzinom	35
4.3 Tumor-Immuninfiltrate beim Nebennierenkarzinom	38
4.4 Korrelation der Immuninfiltrate mit dem Gesamtüberleben	45
4.4.1 Korrelation des T-Zell-Immuninfiltrats mit dem Gesamtüberleben	45
4.4.2 Korrelation des Immuninfiltrats durch dendritische Zellen mit dem Gesamtüberleben	46
4.5 Korrelationen der Immuninfiltrate mit dem Rezidiv-freien Überleben	50
4.5.1 Korrelation des T-Zell-Immuninfiltrats mit dem Rezidiv-freien Überleben	51
4.5.2 Korrelation des Immuninfiltrats durch dendritische Zellen mit dem Rezidiv-freien Überleben	51
4.6 Einfluss von Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen in vivo	52
4.6.1 Einfluss von Glukokortikoiden auf Immunzellen im Mausmodell	52
4.6.1.1 Ergebnisse der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen	52
4.6.1.2 Ergebnisse der regulatorischen T-Zellen in der Milz	53
4.6.2 Einfluss von Glukokortikoiden auf die peripheren Immunzellen vermeintlich immunologisch gesunder Patienten mit Hörsturz	56
4.6.2.1 Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen	56
4.6.2.2 Vergleich der relativen Leukozytensubpopulationen	59
4.6.2.3 Untersuchung der Nebennierenfunktion nach 14 Tagen Steroidtherapie	60
5 Diskussion	61
5.1 Nebennierenkarzinompatienten mit einer hohen Anzahl zirkulierender Treg haben ein kürzeres Gesamtüberleben, der Kortisolexzess hat jedoch keinen Einfluss auf die Frequenz der Treg	61
5.2 Die häufigsten Nebennierenkarzinom-infiltrierenden Immunzellen sind zytotoxische T-Zellen	64
5.3 Das Immuninfiltrat beeinflusst das Gesamtüberleben von Nebennierentumorpatienten nicht	67
5.4 Das Immuninfiltrat beeinflusst das Rezidiv-freie Überleben von Nebennierenkarzinompatienten nicht	69
5.5 Glukokortikoide führen im Menschen und im Mausmodell weder zu einem Anstieg der Subpopulation regulatorischer T-Zellen noch beeinflussen sie die deren Funktion	70

5.6 Eine 14-tägige Glukokortikoidstoßtherapie führt zur laborchemischen Nebennierensuppression	74
5.7 Diskussion limitierender Faktoren	74
6 Zusammenfassung	75
7 Literaturverzeichnis	78
8 Abbildungsverzeichnis	91
9 Tabellenverzeichnis	93
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungen

ACC	Nebennierenkarzinom (Adrenocortical carcinoma)
AITR	activation-inducible tumor necrosis factor receptor
APC	Antigen-äsentierende Zellen
CC	Chemokine der Familie CC
CCL	Chemokine der Familie CC
CD	Cluster of differentiation, membrangebundene Glykoproteinkomplexe
CD3	Signalkomponente des T-Zell-Rezeptor-Komplex
CD4	Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors
CD8	Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors
CD19	B-Zell-Rezeptor
CD25	alpha-Kette des IL-2-Rezeptors
CD40	stimulierendes Protein, welches in Interaktion mit seinem Liganden bei B-Zellen einen Isotypenwechsel der Antikörper bewirkt
CD40L	Ligand zu CD40; exprimiert auf aktivierten CD4-positiven T-Zellen, auch CD 154 genannt
CD45	Tyrosinphosphatase, Vorkommen unter anderem auf allen Leukozyten; auch B220
CD 80	Expression auf B-Zellen und Monozyten, führt zusammen mit CD86 zu T-Zell-Aktivierung und -Überleben, Interaktion mit CD 28 und CTLA-4
CD 86	Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen, führt zusammen mit CD 80 zu T-Zell-Aktivierung und -Überleben, Interaktion mit CD 28 und CTLA-4
CD127	alpha-Kette des IL-7-Rezeptors
CS	Cushing Syndrom

CTL	cytotoxic T-lymphocytes
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	Chemokine der Familie CXCL
FoxP3	Forkhead Box P3
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GR-1	Granulocyte differentiation antigene-1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
IL-9	Interleukin 9
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex),
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TCR $\alpha\beta$	T-cell receptor- $\alpha\beta$
TGF- β	tissue growth factor- β

Th ₁ -Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
Th ₂ -Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TNF-β	Tumor necrosis factor- β
Treg	regulatorische T-Zellen
WHO	World Health Organisation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Fa.	Firma
HPF	High Power Field
i. p.	intraperitoneale Applikation
i. v.	intravenöse Applikation
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mg/l	Milligramm pro Liter
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
p. o.	orale Applikation
rpm	rounds per minute

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem und Tumore

Das menschliche Immunsystem besteht aus einem komplexen System von zellulären und humoralen Anteilen. Dieses hat nicht nur die Abwehr von Krankheitserregern zur Aufgabe, sondern auch die Erkennung und Eliminierung fremder und transformierter Zellen. Die Zahl der immunologisch bedeutsamen Zellen wird auf 2×10^{12} geschätzt, was bei einer Gesamtzellzahl eines menschlichen Organismus von 100 Billionen Zellen immerhin 2% beträgt [1].

Das Immunsystem wird in die unspezifische und die spezifische Immunantwort eingeteilt [2].

Die **unspezifische** oder auch angeborene Immunantwort zeichnet sich dadurch aus, dass sie ohne Verzögerung und mit einem breiten Spektrum zur Verfügung steht. Eine Resistenz wird durch eine Reinfektion nicht gesteigert, das heißt, die unspezifische Immunantwort „lernt nicht hinzu“. Die angeborene Immunantwort gliedert sich in einen zellulären Teil bestehend aus polymorphkernigen Granulozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Phagozyten, und in einen humoralen Teil, dem Komplementsystem [1; 2; 3].

Die **spezifische** oder erworbene Immunantwort richtet sich hingegen auf einen auslösenden Mikroorganismus und kann durch eine Reinfektion mit demselben Mikroorganismus gesteigert werden, sie besitzt also ein Gedächtnis. Nachteil ist, dass die Immunantwort erst nach einer Latenz von ca. 3 Tagen beginnt. Zelluläre Anteile der spezifischen Immunantwort sind Lymphozyten: B- und T-Lymphozyten, nach Konvention auch B- und T-Zellen genannt. Der humorale Anteil der Immunantwort besteht aus Antikörpern [1; 2; 3].

Bereits Ende der 50er Jahre wurde eine Kontrolle von Tumoren durch das Immunsystem beschrieben. Während der Entwicklung des Immunsystems wird sichergestellt, dass es körpereigene Strukturen erkennt und diese nicht angreift (Selbsttoleranz). Die Theorie damals war, dass entartete Zellen bereits so körperfremd sind, dass das Immunsystem dies erkennt und die malignen Zellen attackiert [4]. Heute geht man von einem 3-Phasen-Modell der Kontrolle des Immunsystems über maligne transformierte Zellen aus. In der Phase 1, der

Eliminierungsphase, hat das Immunsystem ein Übergewicht, das heißt dass transformierte Zellen durch das Immunsystem zerstört werden. Bei der 2., sogenannten Gleichgewichtsphase, werden transformierte Zellen nicht vollständig eliminiert, oder transformierte Zellen durch das Immunsystem ungewollt selektiert, da sie durch Mutationen dem Immunsystem entgehen (sog. Immune-Editing). In der 3. Phase kommt es zu einem Immune-Escape, in der transformierte Zellen sich entweder durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine vor Angriffen des Immunsystems schützen (sog. immunregulatorische Phänomene), oder ihren Phänotyp durch Mutationen so verändert haben, dass sie durch das Immunsystem nicht mehr erkannt werden. In der Folge wird der Tumor durch weiteres Wachstum klinisch apparent. Diese Phasen müssen nicht nacheinander durchlaufen werden, es ist sogar möglich, dass Phasen übersprungen werden [5; 6; 7]. Tumorzellen werden vor allem durch Zellen des erworbenen Immunsystems, hier vor allem durch T-Zellen, eliminiert [8]. Indirekt kann man diesen Effekt teilweise bei Patienten, welche an einer angeborenen oder erworbenen Immunsuppression leiden, beobachten. So erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung Patienten mit einem angeborenen Immundefekt, wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom, häufiger an malignen Lymphomen [1]. HIV positive Patienten erkranken so viel häufiger an mit dem humanen Herpesvirus 8-assoziierten Kaposi-Sarkomen, dass diese sogar als AIDS-definierend gelten. Die meisten spontanen Tumore haben bei Patienten mit einer Immunsuppression kein höheres Auftreten. Dies legt nahe, dass virusassoziierte Tumore durch das Immunsystem als körperfremd, spontan aufgetretene Tumore hingegen vom Immunsystem als „noch“ körpereigen angesehen werden [1]. Bei Patienten, die aufgrund von Transplantationen oder Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, immunsuppressiv therapiert werden, fällt das überdurchschnittlich häufige Auftreten von Malignomen (hier vor allem Lymphome) auf [9]. Die Arbeitsgruppe von MacKie et al. berichtete 2003 über ein Wiederaufflammen eines Malignen Melanoms bei zwei immunsuppressiv therapierten Organempfängern, denen jeweils eine Niere eines Patienten, der 16 Jahre zuvor an einem Malignen Melanom erkrankt war, transplantiert worden war [10]. Schließlich gibt es noch eine Reihe klinischer

Studien, welche verschiedene Tumore auf Infiltration des Tumorgewebes durch Immunzellen untersucht und mit dem Überleben der Patienten korreliert haben. Teilweise korreliert die Infiltration des Tumorgewebes mit einer besseren Überlebensrate, wie zum Beispiel bei Ovarialkarzinomen [11], kolorektalen Karzinomen [12; 13] oder beim Malignen Melanom [14]. Einige Studien lassen auch darauf schließen, dass nicht die Menge, sondern die Art der infiltrierenden Zelle ausschlaggebend für die Prognose ist [15].

1.1.1 B-Lymphozyten und Tumore

B-Zellen entwickeln sich aus undifferenzierten lymphatischen Progenitorzellen im Knochenmark [16]. Dort findet unter Einwirkung eines speziellen Mikromilieus der Stromazellen die Entwicklung über Pro-B- und Prä-B-, zur unreifen B-Zelle und schließlich zur reifen B-Zelle statt [17; 18]. Während dieser Stadien kommt es zu Genumlagerungen, Transkriptionen und Translationen der Immunglobulin-Gene. Die somatische Genumlagerung des B-Zell-Rezeptors erfolgt über mehrere Schritte, bis zum fertigen Antigenrezeptor: einem membranverankerten Immunglobulin, welches die gleichen Antigen-bindenden Eigenschaften hat, wie der lösliche Antikörper der differenzierten B-Zellen. Das Oberflächenmolekül CD (Cluster of Differentiation) 19 charakterisiert alle B-Zellen (CD19=B-Zell-Rezeptor). Die B-Zellen zirkulieren kurze Zeit im peripheren Blut und lassen sich dann in einem sekundär lymphatischen Organ nieder, wo sie den B-Zell-Pool bilden [19]. Im Laufe der B-Zell-Entwicklung reifen unterschiedliche B-Zell-Linien heran, welche sich durch die Klasse des gebildeten Antikörpers (Immunglobulin) unterscheiden und sich zu Plasmazellen differenzieren können, um hochspezifische Antikörper zu synthetisieren und auszuschütten: Immunglobulin (Ig) M (vor allem zur Agglutination), IgA (Sekretion nahe Epithelien), IgE (Opsonisierung von Mikroorganismen) und IgG (größter Anteil, Opsonisierung von pathogenen Keimen und Neutralisation von Toxinen) [1; 2; 3]. Eine Plasmazelle produziert somit hochspezifische Antikörper, welche körperfremde Zieltargets erkennen und für das weitere Immunsystem sichtbar machen. Diese Zielmoleküle können gegen Mikroorganismen, aber auch gegen Tumore gerichtet sein. In der

heutigen Medizin sind in vitro hergestellte Antikörper ein essentieller Bestandteil moderner Krebstherapien. Des Weiteren spielen B-Zellen bei der T-Zell-Aktivierung und Differenzierung eine entscheidende Rolle und können somit in vivo die T-Zell-Immunantwort gegen Tumore entscheidend beeinflussen [20]. Yu et al. zeigte ein besseres Überleben von Patienten mit Magenkarzinomen, bei denen eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden B-Zellen im Blut vorhanden war [21].

1.1.2 T-Lymphozyten und Tumore

T-Zellen entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, welche über Blutgefäße in den retrosternal gelegenen Thymus einwandern. Im Thymus erfolgt in enger Interaktion mit den Stromazellen des Thymus die Differenzierung der Stammzellen über verschiedene Reifungsstadien der T-Zellen. Sie entwickeln sich über die Stadien der Doppel-Negativ und Doppel-Positiv-Zellen zu reifen T-Zellen [2; 22]. Während der Entwicklung der T-Zellen werden diese mehrfach auf die Funktionalität und auch auf das Erkennen von Fremd- und Eigenantigenen hin geprüft und entsprechend selektiert [1; 22]. Dies ist essentiell für die Erhaltung der Selbst-Toleranz. Die T-Zell-Reifung ist mit der Fertigstellung des T-Zell-Rezeptors und der Freisetzung der T-Zellen aus dem Thymus abgeschlossen [2]. Das Oberflächenmolekül CD3 entspricht einem Teil des T-Zell-Rezeptors und charakterisiert alle T-Zellen [1].

In der Entwicklung wird dabei auch analog den B-Zellen die Differenzierung festgelegt. Die T-Zell Population besteht aus $\alpha\beta$ -Zellen, welche entweder die Oberflächenantigene CD4 oder CD8 tragen, oder $\gamma\delta$ -Zellen, welche nur den T-Zell-Rezeptor tragen. Die Funktion der einzelnen Zellen und somit auch die Aufgabe im Immunsystem ergibt sich aus den Co-Rezeptoren. So bindet die $\alpha 3$ -Domäne an MHC-1-Moleküle [23], die $\beta 2$ -Domäne hingegen an MHC-2-Moleküle [24].

Im Kontext mit Neoplasien besteht eine Aufgabe von T-Zellen darin, Tumorzellen zu eliminieren. Dies wurde bei immunkompetenten und immuninkompetenten Mäusen, die UV-Licht ausgesetzt wurden, gezeigt. Durch Schädigung der DNA durch ultraviolettes Licht wurden bei den T-Zell-

depletierten Mäusen Tumore induziert bzw. kam es zu einem Tumorwachstum. In normalen immunkompetenten Mäusen hingegen wurde die Tumorbildung verhindert [25; 26].

Bei der Abwehr von Tumoren spielen auch beim Menschen T-Zellen eine entscheidende Rolle [8; 27]. Hier wurden die zirkulierenden T-Zellen des Blutes [28; 29] sowie die den Tumor infiltrierenden T-Zellen [30] untersucht und T-Zellen in vitro mit Tumorzellen zusammen gebracht [31]. So zeigte sich bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen ein signifikanter Unterschied im 5-Jahres-Überleben von 38 Prozent, wenn der Tumor durch T-Zellen infiltriert wurde. Fand sich im Tumorgewebe kein T-Zell-Infiltrat betrug das 5-Jahres-Überleben hingegen nur 4,5 Prozent [11]. Ein signifikant längeres Überleben zeigte sich auch bei Patienten mit malignen Melanomen und entsprechenden T-Zell-Tumorinfiltraten [32].

In neuroendokrinen Tumoren des Pankreas führte eine höhere Tumordinfiltration durch CD3 positive T-Zellen zu einem signifikant längerem Rezidiv-freien Überleben als bei Tumoren mit einer geringeren Tumordinfiltration durch CD3 positive Zellen [33].

1.1.2.1 CD3 und CD8 positive T-Zellen und Tumore

Die Zellen, welche die beiden Oberflächenmoleküle CD3 und CD8 (Co-Rezeptor des TCR) tragen, entsprechen ca. einem Drittel der im peripheren Blut zirkulierenden T-Zellen. Sie entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen. Diese dienen der Abwehr virusinfizierter oder transformierter Zellen. Die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen interagieren mit MHC I Molekülen der körpereigenen Zellen. Auf den MHC I Molekülen werden Proteinfragmente (=Antigene), welche in der Zelle produziert werden, nach außen hin präsentiert. Somit erkennt das Immunsystem, ob in der Zelle körpereigene oder körperfremde Proteine gebildet werden. Erkennt eine zytotoxische T-Zelle das Antigen als körperfremd, werden von ihr Perforine und Granzyme ausgeschüttet, welche die infizierte oder transformierte Zelle absterben lassen [1]. Zusätzlich dazu wird IFN- γ sezerniert, was dazu führt, dass umliegende Stromazellen vermehrt MHC I Moleküle exprimieren. So wird die lokale Immunantwort verstärkt. Nach erfolgter Eradikation der Zellen, welche das Ziel-

Antigen besitzen, geht ein Großteil der CD8 positiven T-Zellen in Apoptose über. Ein kleiner Teil wandelt sich in sogenannte Gedächtniszellen (auch Memory-Zellen) um, welche dann in der Blutbahn zirkulieren. Gerät das Immunsystem anschließend erneut mit diesem Antigen in Kontakt, so wird über eine klonale Zellexpansion eine erneute Immunantwort generiert [27].

Die meisten Tumore exprimieren MHC Moleküle der Klasse I und sind negativ für MHC II Moleküle, so auch Nebennierenkarzinome [34]. Da CD8 positive, zytotoxische T-Zellen mit den MHC I Molekülen interagieren, können sie so durch Erkennen von Tumorantigenen die Tumorzellen direkt über einen Membranangriffskomplex lysieren [27]. Problematisch ist jedoch die Tatsache, dass die meisten Tumorantigene Autoantigene sind, was bedeutet, dass das Immunsystem die entartete Zelle als körpereigen erkennt und diese nicht lysiert. In Studien von Rosenberg et al., in denen CD8 positive Zellen von Tumorpatienten in vitro mit Tumorantigenen stimuliert und anschließend dem Patienten zugeführt wurden, zeigte sich eine adäquate Immunantwort gegen die Tumore [35; 36; 37], was ein weiterer Hinweis für einen antitumorösen Effekt der CD8 positiven T-Zellen ist. In einer weiteren Studie wurde nach einer intravenösen Depletion der CD4 positiven Zellen eine starke Immunantwort gegen den Tumor durch CD8 positive Zellen und den Rückgang von Tumoren beobachtet, was ebenfalls den antitumorösen Effekt der CD8 positiven Zellen gegen Tumore zeigt [38; 39].

Bei Mamma-Karzinomen und kolorektalen Karzinomen zeigten klinische Studien ein signifikant längeres Überleben von Patienten, wenn der Tumor durch CD8 positive zytotoxische T-Lymphozyten infiltriert wurde [12; 13; 40; 41]. Ein längeres Rezidiv-freies Überleben wurde bei einer Tumordinfiltration durch CD8 positive T-Zellen in Glioblastomen gezeigt [42].

Neben soliden Tumoren werden auch Lymphome durch zytotoxische T-Zellen immunologisch kontrolliert: Die Arbeitsgruppe von Laurent et al. zeigte einen CD8 und Granzym B positiven Lymphozytensaum um folliculäre Lymphome und ein damit verbundenes, längeres progressionsfreies Überleben nach Kombinationschemotherapien mit Rituximab [43].

1.1.2.2 CD3 und CD4 positive T-Zellen und Tumore

Die Zellen, welche die beiden Oberflächenmoleküle CD3 und CD4 (Co-Rezeptor des TCR) tragen, entsprechen ca. zwei Drittel der im peripheren Blut zirkulierenden T-Zellen. Die T-Helferzellen (T_h-Zellen) interagieren mit MHC II Molekülen von Antigen-präsentierenden Zellen (s. 1.1.3), welche zunächst phagozytierte und anschließend im Zellinneren zu Peptidfragmenten prozessierte Antigene präsentieren. Anhand unterschiedlicher Zytokinsekretionen nach Antigenkontakt und Interaktion mit anderen Immunzellen, kann man die T-Helferzellen in 2 Klassen unterscheiden: Zum einen T_h1-Zellen, welche IL-2, TNF-β und IFN-γ sezernieren und so zytotoxische T-Zellen stimulieren, zum anderen T_h2-Zellen, welche IL-4, IL-5 IL-6 IL-9, IL-10 und IL-13 sezernieren und unter anderem B-Zellen bei der Antikörperproduktion unterstützen [1; 44; 45]. Die Zytokine IL-2, IL-6, IL-10 und IL-13 können jedoch beim Menschen auch von anderen Zellen gebildet werden. Beide T-Helfer-Zelltypen sezernieren auch gemeinsame Zytokine: IL-3, TNF-α, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Enkephalin und verschiedene Chemokine.

Ähnlich den CD8 positiven Zellen, migrieren sowohl in Mausmodellen als auch in menschlichen Tumoren tumorspezifische CD4 positive Zellen in das Tumorstroma [46; 47; 48]. Es wurde bei einigen Tumoren gezeigt, dass auch CD4 positive Zellen Tumorzellen in Abwesenheit von zytotoxischen T-Zellen eliminieren können [48; 49]. In den meisten Fällen sind jedoch CD4 positive und CD8 positive T-Zellen zusammen an der Tumorabwehr beteiligt [50]. Die Aufgabe der CD4 positiven T-Zellen im Tumorgewebe ist es also, die zytotoxischen T-Zellen zu stimulieren und so die Immunantwort zu generieren. Dies kann in 3 Phasen gegliedert werden: 1. Induktionsphase, 2. Aufrechterhaltungsphase und 3. Gedächtnisphase [27].

Die Induktionsphase basiert auf einer Präsentation von Tumorantigenen durch antigenpräsentierende Zellen wie den dendritischen Zellen [51; 52], wobei CD4 positive T-Zellen in den meisten Fällen eine essentielle Rolle bei der Induktion von antigenpräsentierenden Zellen übernehmen [1]. Die Interaktion zwischen diesen beiden Zellen erfolgt mittels Co-Rezeptoren, wie CD40 in Interaktion mit

CD40L [53; 54; 55; 56], CD86 [57], CD80 oder ICAM-1 [58], und Zytokinen wie IL-12 [57; 59], was zu einer Induktion einer effektiven Immunantwort der CD8 positiven T-Zellen gegen Tumorzellen führt [60; 61]. Dies wurde in verschiedenen Mausexperimenten gezeigt: tumorspezifische CD8 positive T-Zellen konnten ohne CD4 positive T-Zellen keine effektive Immunantwort gegen Tumore aufrecht erhalten [62] und geschieht zum Beispiel durch die Sekretion von IL-2 [27]. Nach erfolgter Immunantwort sind CD4 positive T-Zellen bei der Generierung von CD8 positiven zytotoxischen Gedächtniszellen beteiligt [63; 64; 65; 66; 67]. Bei der Generierung einer erneuten Immunantwort durch bereits vorhandene CTL-Gedächtniszellen sind CD4 positive T-Zellen ebenfalls unabdingbar.[68; 69]. Eine Reaktivierung von CTL-Gedächtniszellen in Effektorzellen ist in Abwesenheit von CD4 positiven T-Zellen unmöglich [62], die CTL-Gedächtniszellen würden funktionslos bleiben [27].

Auch spielt die Art der oben beschriebenen Immunantwort eine Rolle. Infiltrieren T_H1 -Zellen Tumore, korreliert dies mit einer CTL-Immunantwort und führt zu einer besseren Immunantwort gegen den Tumor [70; 71; 72]. In einigen Studien hingegen wurde beschrieben, dass ein Infiltrat durch T_H2 -Zellen die Immunantwort gegen den Tumor herunterreguliert [72; 73; 74]. Bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden beschrieb die Arbeitsgruppe um Pellegrini et al. einen Wechsel der Immunantwort von T_H1 - zu T_H2 -Zellen [75]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Zytokine der T_H2 -Zellen sogar ein Tumorwachstum indirekt über eine Suppression der tumorspezifischen CTL bewirken können [76]. Tumore können aber auch Interleukine und Chemokine wie IL-6 und CCL frei setzen, was zu einer T_H2 -Zellantwort führt und somit das Tumorwachstum begünstigt [77; 78; 79]. Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass T_H2 -Zellen ebenfalls einen Effekt gegen Tumore besitzen. Dies geschieht wohl durch Induktion von Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Eosinophile, welche dann Tumorzellen mittels Sauerstoffradikalen schädigen [80].

Eine Infiltration des Tumorstromas durch CD4 positive T-Zellen kann sowohl zu einer Stimulation der CD8 positiven T-Zellen [27; 81; 82] und der angeborenen Immunantwort [80] und somit zu einem Tumorregress, als auch zu einer

Suppression der CD8 positiven T-Zellen und somit einem Tumorprogress führen [39; 83; 84]. Eine generelle Aussage, ob die Tumordinfiltration durch CD4 positive T-Zellen zu einem Tumorregress oder –progress führt, ist also nicht möglich. Jedoch muss auch das Rezidiv-freie Überleben betrachtet werden. Wenn man die Tumordinfiltration durch CD4 positive T-Zellen bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens untersucht, zeigte sich bei Patienten mit Glioblastomen durch eine Tumordinfiltration durch CD4 positive T-Zellen jedoch auch kein signifikanter Einfluss [42].

1.1.2.2.1 Regulatorische T-Zellen und Tumore

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind eine sehr kleine Subpopulation der CD4 positiven T-Zellen. Ihr Anteil der T-Zellen im peripheren Blut ist normalerweise kleiner als fünf Prozent. Jedoch sind sie für die Erhaltung der Selbst-Toleranz gegen Eigenantigene sowie der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems von essentieller Bedeutung [85]. Sie können sowohl in vivo, als auch in vitro die Funktion, Aktivierung und die Proliferation von CD4 und CD8 positiven T-Zellen, B-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen supprimieren [86]. Dies geschieht über antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 oder Transforming Growth Factor- β (TGF- β), aber auch über eine direkte Zell-Zell-Interaktion mittels Rezeptoren wie CTLA-4 [1]. In den letzten 10 bis 20 Jahren sind viele verschiedene Subpopulationen von regulatorischen T-Zellen beschrieben worden [87; 88]. Am besten untersucht sind die regulatorischen T-Zellen, welche CD4 und CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) exprimieren [85; 89]. Da diese beiden Merkmale nicht nur für regulatorische T-Zellen sondern auch auf aktivierte CD4 positive T-Zellen zutreffen, wurde in vergangener Zeit nach weiteren charakteristischen Merkmalen gesucht. Als weitere phänotypische Merkmale zur Differenzierung von natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen von T_h2-Zellen wurden die Moleküle CTLA-4⁺ [90; 91], FoxP3⁺, ATR⁺ [92] und CD127^{low} [93; 94] erforscht. Von vielen Autoren wird der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3, kurz FoxP3, als der beste Marker zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen angesehen [86; 95; 96]. Eine Mutation des DNA-bindenden Transkriptionsfaktors FoxP3 führt zu fatalen Autoimmunkrankheiten [97;

98]. Dieser Marker ist jedoch ebenfalls nicht 100% spezifisch für regulatorische T-Zellen, er kann auch vorübergehend in anderen Effektor-T-Zell-Populationen induziert werden, während diese aktiviert sind [99].

Eine zentrale Rolle spielen regulatorische T-Zellen beim Tumorwachstum und der Modulation der Immunantwort gegen Tumore. Es ist bekannt, dass bei vielen Tumorpatienten die Zahl der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Menschen stark erhöht ist [100; 101]. Außerdem wurde bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen nachgewiesen, dass eine niedrige Rate der Effektor-T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen ($T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$) mit einem schlechteren Überleben korreliert [102; 103]. Die erhöhte Anzahl zirkulierender regulatorischer T-Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass die regulatorischen T-Zellen sich aufgrund von Präsentation von Tumorantigenen durch antigenpräsentierende Zellen und durch Tumoren sezernierte Interleukine wie TGF- β spezifisch vermehren [1].

Es gibt auch Hinweise, dass sich regulatorische T-Zellen in einer signifikant höheren Anzahl in malignem, als in gesundem Gewebe befinden [15; 104]. Die Induktion von regulatorischen T-Zellen könnte ein Mechanismus des Tumors sein, dem Immunsystem zu entgehen [105]. Eine Reihe von Tumorentitäten wurde auf das Vorhandensein einer Infiltration des Tumorgewebes durch regulatorische T-Zellen untersucht und die Infiltration des Tumorgewebes mit dem Überleben korreliert. Teilweise zeigten sich prognostisch ungünstige Ergebnisse, wenn das Tumorgewebe durch regulatorische T-Zellen infiltriert war, wie zum Beispiel beim Ovarialkarzinom [15], oder hepatozellulären Karzinom [106]. Hingegen bei kolorektalen Tumoren [107], Hodgkin- [108] oder B-Zell-Lymphomen [109] zeigte sich ein besseres Überleben, wenn Tumorgewebe durch regulatorische T-Zellen infiltriert wurde. Bei Adenokarzinomen des Pankreas zeigte sich ein kürzeres progressionsfreies Intervall, wenn die Karzinome durch regulatorische T-Zellen infiltriert waren [110]. Auch bei Untersuchungen von Patienten mit Prostata-Karzinomen ergab sich ein kürzeres Rezidiv-freies Überleben bei einer hohen Anzahl regulatorischer T-Zellen im Tumorfiltrat [111]. Im Mausmodell optimierte die Depletion von

regulatorischen T-Zellen die Immunantwort gegen Tumoren und erhöhte die Erfolgsrate einer experimentellen Immuntherapie [112].

1.1.3 Dendritische Zellen und Tumore

Die dendritischen Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen der Monozyten [2]. Sie kommen physiologisch in Oberflächengewebe vor. Sie prozessieren und präsentieren den T-Zellen als körperfremd identifizierte Antigene. So spielen sie bei der Generierung einer Immunantwort als hochpotente T-Zell-Stimulatoren eine Schlüsselrolle [113; 114]. Eine weitere wichtige Aufgabe dendritischer Zellen ist die Erhaltung der Selbsttoleranz, indem sie den T-Zellen Autoantigene präsentieren. Jedoch werden durch diesen Mechanismus regulatorische T-Zellen gebildet bzw. autoreaktive T-Zellen mittels Apoptose eliminiert [115]. Dendritische Zellen initiieren oder regulieren Immunantworten auch in der Tumorummunologie [116; 117; 118]. Eine Tumordinfiltration durch dendritische Zellen wurde in unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben und kann sowohl das Überleben, als auch das Auftreten von Rezidivtumoren beeinflussen. Die dendritischen Zellen können ein Mikromilieu schaffen, was unter anderem über eine Suppression von T-Zellen zur Tumordiversion beiträgt [119; 120]. Die Tumordinfiltration durch dendritische Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Der Typus der dendritischen Zellen und die Lokalisation des Immuninfiltrats scheinen eine entscheidende Rolle bezüglich des Rezidiv-freien- und des Gesamtüberlebens zu spielen. So zeigte sich bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen ein schlechteres Überleben bei einer hohen Expression von HLA-DR positiven dendritischen Zellen mit einer intraepithelialen Infiltration [121]. Die Arbeitsgruppe von Sandel et al. zeigte ein kürzeres Rezidiv-freies Überleben bei Karzinompatienten, bei denen eine hohe Anzahl unreifer dendritischer Zellen an der Tumorgrenzfläche gefunden wurde, sowie ein schlechteres Überleben bei Patienten, bei denen im Epithel reife dendritische Zellen gefunden wurden [122]. Bei Mammakarzinomen sind aggressivere Tumore mit einer hohen Tumordinfiltration durch dendritische Zellen assoziiert [123]. Auch eine gemeinsame Tumordinfiltration durch dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen korrelierten beim

Mammakarzinom mit einem schlechteren Überleben [124; 125]. Bei Patienten mit Melanomen hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied für das Überleben der Patienten, deren Tumore durch dendritische Zellen infiltriert waren [126]. Patienten mit kolorektalen Karzinomen, deren Tumore durch S100-positive dendritische Zellen infiltriert waren, zeigten ein signifikant besseres Überleben [127]. Die Arbeitsgruppe von Jensen et al. beschrieb ein signifikant kürzeres Rezidiv-freies Überleben bei Melanom-Patienten, deren Tumore durch CD123 positive dendritische Zellen infiltriert wurden. Die Anwesenheit von DC-LAMP-Zellen im Melanom-Umfeld führte jedoch zu einem signifikant besseren Rezidiv-freien Überleben [128]. Auch bei Mammakarzinomen führte die Infiltration durch CD123 positive dendritische Zellen zu einem kürzeren Rezidiv-freien Überleben [125].

1.2 Glukokortikoide - deren physiologische und immunmodulatorische Wirkungen

Glukokortikoide gehören zu der Gruppe der Steroidhormone. Diese binden an den intrazellulären Glukokortikoidrezeptor, welcher in nahezu allen Zellen von Säugetieren vorhanden ist [129]. Dies erklärt die große Vielfältigkeit der physiologischen Wirkungen von Glukokortikoiden [130; 131]. Entscheidenden Einfluss nehmen Glukokortikoide auf den Metabolismus des Körpers [132], die Wahrnehmung, den Tag-Nacht-Rhythmus [133] und auf die Entwicklung von Geweben [134]. Des Weiteren besitzt das körpereigene Kortisol auch eine Aldosteron-ähnliche Wirkung [135]. Während einer Immunantwort haben Glukokortikoide einen entscheidenden Einfluss auf das Immunsystem [136; 137]. Dies geschieht zum einen über direkt immunsuppressive, zum anderen jedoch auch über indirekt immunmodulatorische Mechanismen, so zum Beispiel über eine Aktivierung von Zellverbänden [138]. Bei einer Immunantwort werden durch Ausschüttung von Kortisol neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark freigesetzt. Gleichzeitig wird jedoch die Fähigkeit der Neutrophilen zur Transmigration (Diapedese) durch Gefäße hin zum Entzündungsherd herabgesetzt [139; 140]. Zeitgleich kommt es durch die Wirkung des Kortisols zur Apoptose von basophilen und eosinophilen

Granulozyten [141; 142]. Die Bewegung der im Blut zirkulierenden Monozyten wird durch Kortisol ähnlich modifiziert. Auch die Funktion der Monozyten wird durch Glukokortikoide verändert. Die Fähigkeit der Phagozytose der Gewebsmakrophagen wird durch Glukokortikoide gesteigert. Somit kommt es zu einer beschleunigten Beseitigung von fremden Antigenen und Mikroorganismen [143]. Ebenfalls wird die Synthese von Interleukinen auf Ebene der Genexpression durch Glukokortikoide beeinflusst: proinflammatorische Interleukine, wie zum Beispiel IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und TNF- α , und proinflammatorische Chemokine, wie CC und CXCL, werden stark supprimiert, während andere antiinflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-10 und TGF- β herauf reguliert werden [144]. Durch Glukokortikoide wird die Bildung von Plasmazellen positiv beeinflusst. Dies bedeutet, dass in Folge einer gesteigerten Produktion von Plasmazellen der Spiegel der Antikörper auch maßgebend reguliert wird [145]. Außerdem haben Glukokortikoide einen Einfluss auf die Differenzierung der T-Zellen. Hier fördern sie die Bildung und Differenzierung von T_H2 Zellen. Parallel dazu entstehen unreife dendritische Zellen [146]. Weiterhin besitzen Glukokortikoide die Fähigkeit eine Apoptose in T-Lymphozyten zu induzieren [147].

Durch die immunmodulatorischen Eigenschaften werden Glukokortikoide seit über 60 Jahren bei inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen eingesetzt [148]. Seit ca. 30 Jahren ist ein Zusammenhang zwischen Glukokortikoiden und „Suppressor“-T-Zellen bekannt [149; 150]. Es gibt Hinweise aus in vitro-Studien, dass Glukokortikoide die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen ansteigen lassen. Vereinzelt zeigen klinische Studien, dass Glukokortikoide die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen auch in vivo ansteigen lassen, so zum Beispiel bei Patienten mit Asthma bronchiale [151], multipler Sklerose [152; 153] und systemischen Lupus Erythematoses [154]. In diesen Studien wurden die regulatorischen T-Zellen nur unzureichend charakterisiert. Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass die Patienten dieser Studien durch ein geschädigtes Immunsystem an einer Autoimmunkrankheit litten. Die Effekte der Generierung von T_H2-Zellen sowie

dendritischer Zellen können für den vermuteten Anstieg der regulatorischen T-Zellen in den Studien verantwortlich sein [155].

1.3 Die Nebenniere – Ort der endogenen Steroidsynthese

Die Nebennieren (Glandulae suprarenales) sind paarige Organe, welche retroperitoneal am Oberpol der Nieren, lateral der großen Gefäße liegen. Histologisch wird Nebenniere in Rinde und Mark unterteilt [156].

In der Nebennierenrinde werden Steroidhormone aus Cholesterin synthetisiert. Die Nebenniere ist Effektororgan in einem Regelkreis (Hypophysen-Nebennieren-Achse, s. Abbildung 1) und wird durch die Hypophyse, speziell durch die Sekretion des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) gesteuert. Die Hypophyse selbst unterliegt der Steuerung des Hypothalamus, welcher Corticotropin-releasing Hormone (CRH) sezerniert [2; 156].

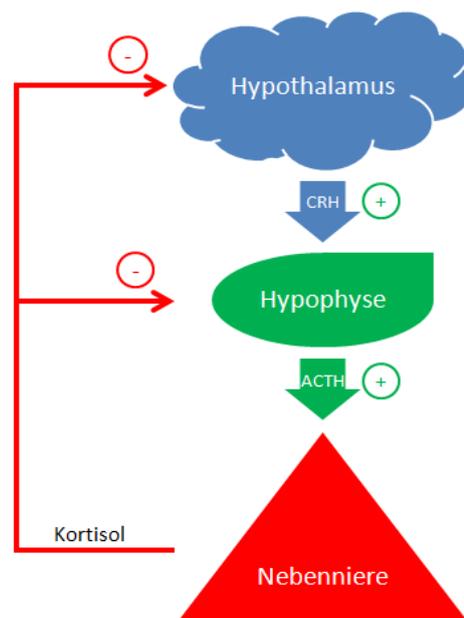


Abbildung 1: Darstellung der Hormonregulation in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Die Nebennierenrinde (Cortex glandulae suprarenalis) entsteht aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, und wird histologisch in 3 Zonulae unterteilt: Zonula glomerulosa, Zonula fasciculata und Zonula reticularis [2].

Die histologische Einteilung spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Sekretion von Hormonen wider. In der Zonula glomerulosa, welche ca. 10-15

Prozent des Gewebevolumens ausmacht, werden hauptsächlich Mineralkortikoide mit dem Hauptvertreter Aldosteron sezerniert, welches als Reaktion auf erhöhte Kaliumwerte und erniedrigte Natriumwerte im Serum über das Renin-Angiotensin-System ausgeschüttet wird. Geringer wird die Mineralkortikoidsekretion durch ACTH gesteuert [156]. In der Zonula fasciculata, welche ca. 80 Prozent des Gewebevolumens ausmacht, werden Glukokortikoide, vor allem Kortisol, gebildet. Reguliert wird die Kortisolsekretion über die Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen [2].

Die Zellen der Zonula reticularis, welche ca. 5-10 Prozent des Nebennierenrindenvolumens ausmacht, bilden Sexualhormone, wie Dehydroepiandrosteron (DHEA), welches die Vorstufe von Testosteron ist. Bei Frauen wird zirka 70 Prozent des DHEA in den Nebennieren gebildet, 30 Prozent in den Ovarien [3].

Im Nebennierenmark (Medulla glandulae suprarenalis) befinden sich adrenerge und noradrenerge Zellen, welche dem Sympathikus unterliegen. Aus Phenylalanin, beziehungsweise L-Tyrosin, stellen die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks Adrenalin und Noradrenalin in einem Verhältnis von 80 zu 20 her. Bei Bedarf, zum Beispiel in Stresssituationen, wird vor allem Adrenalin in den Blutkreislauf sezerniert [2].

1.4 Nebennierenrindentumore

1.4.1 Nebennierenrindenadenome

Nebennierenadenome sind häufig und treten im mittleren Lebensalter auf. Die Größe von Nebennierenadenomen kann sehr unterschiedlich sein. Aus Sektionsstudien lässt sich die Prävalenz von Nebennierentumoren auf ca. 1,4-8,7% schätzen [3]. In einem Konsens-Statement wurde die Inzidenz von Nebennierenadenomen auf 3 Prozent der Bevölkerung über 50 Jahren beziffert [157]. Sie bestehen aus den physiologischen Nebennierenzellen phänotypisch ähnlichen Zellen und sezernieren je nach Ursprung Hormone. Sie können sich klinisch dementsprechend auch in einem Überfunktionssyndrom äußern: primärer Hyperaldosteronismus, Hyperkortisolismus oder Cushing Syndrom.

Der Hyperkortisolismus, ist eine ätiologisch heterogene Erkrankung, die durch eine lang anhaltende Wirkung von Kortisol geprägt ist und dessen peripher katabole und zentral anabole Wirkung das klinische Bild verursacht. Zirka 60-70 Prozent sind hypophysär, also durch einen ACTH-produzierenden Tumor der Hirnanhangsdrüse bedingt, in zirka 20-25 Prozent der Fälle ist ein Nebennierenadenom die Ursache und bei rund 10-15 Prozent ist das Cushing-Syndrom (CS) ein Teil eines paraneoplastischen Syndroms. Hier sind die kleinzelligen Bronchialkarzinome oder Bronchialkarzinoide mit einer ektope ACTH-Produktion die häufigste Ursache [3; 158]. Viel häufiger als das endogene CS ist das exogene, durch eine längerfristige iatrogene Glukokortikoidzufuhr bedingte CS.

Der primäre Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) ist eine inadäquat hohe Sekretion von Aldosteron. Ursachen sind bilaterale mikronoduläre Nebennierenrindenhyperplasien bzw. Nebennierenadenome [158].

Ein adrenaler Hormonexzess durch Sexualhormone führt klinisch zu einer Virilisierung bzw. zu einer Feminisierung. Dies ist prinzipiell selten und steht meist im Zusammenhang mit Nebennierenkarzinomen [159].

Die meisten Nebennierenadenome sind hormoninaktiv [158].

1.4.2 Das Nebennierenrindenkarzinom

1.4.2.1 Klinisches Bild und Prognose

Das Nebennierenrindenkarzinom (ACC) ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer limitierten Prognose. Die exakte Inzidenz ist schwer zu bestimmen. Die meisten Autoren beschreiben in ihren Publikationen eine Inzidenz von 1-2 auf eine Million Einwohner [160; 161; 162]. Die Arbeitsgruppe von Kebebew et al. beschreibt in einer Studie die Inzidenz des Nebennierenkarzinoms von 0,78 pro Million in 12 US-Staaten [163]. In unveröffentlichten Daten des deutschen Nebennierenkarzinom-Registers der Würzburger Arbeitsgruppe liegt die Inzidenz größer als 1 pro Million. Frauen sind häufiger von einem Nebennierenkarzinom betroffen als Männer, das Verhältnis beträgt etwa 1 zu 1,5 [160].

60 Prozent der Patienten mit einem Nebennierenkarzinom leiden unter einem Steroidexzess. Der größte Anteil der Patienten mit Nebennierenkarzinomen

zeigt das klinische Bild eines rasch voranschreitenden Cushing-Syndroms mit und ohne Virilisierung [164; 165; 166]. Bei Frauen kann sich ein Steroidexzess in Form eines Hirsutismus und einer Virilisierung, das heißt einer Vertiefung der Stimme, einer androgenen Alopezie, Brustatrophie und einer Oligo- bzw. Amenorrhoe, äußern. Seltener sind Östrogen-produzierende Nebennierenkarzinome. Bildet ein Nebennierentumor Östrogene ist dies pathognomonisch für ein Nebennierenkarzinom. Diese machen ca. 5-10 Prozent bei den Patienten mit Nebennierenkarzinomen aus. Klinisch manifestiert sich dies in einer Hodenatrophie und Gynäkomastie, dies erschwert auch die Diagnose bei Frauen. Ein Auftreten der Östrogenaktivität in der Postmenopause kann hierbei einen wichtigen Hinweis liefern. Extrem selten kann sich ein Nebennierenkarzinom mit einem Aldosteronexzess (Conn-Syndrom) und klinisch mit einer moderaten Hypokaliämie mit Serumkaliumwerten um $2,3 \pm 0,08$ mmol/l manifestieren. Jedoch ist eine Hypokaliämie wesentlich häufiger durch ein Cushing-Syndrom verursacht. Dies wird durch eine inkomplette renale Aktivierung der 11 β -Dehydrogenase Typ 2 aufgrund einer enorm gesteigerten Cortisol-Produktion verursacht, was zu einem konsekutiven Mineral-kortikoidexzess führt. Auch bei Patienten mit klinisch hormoninaktiven Tumoren findet sich in genaueren Analysen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie nahezu in allen Fällen eine erhöhte Hormonproduktion [167]. Klinisch manifestieren sich hormoninaktive Nebennierenkarzinome oft mit unspezifischen Beschwerden wie Flankenschmerzen und einem Völlegefühl. Bei vielen anderen Tumorentitäten zeigt sich eine ausgeprägte B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Beim Nebennierenkarzinom tritt eine B-Symptomatik selten auf. Selbst bei einem ausgedehnten Tumorbefall ist das Allgemeinbefinden oft wenig beeinträchtigt [168].

Die klinische Einteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation, welche durch das European network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) ergänzt wurde (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Aktuelle ENSAT-Klassifikation für Nebennierenkarzinome

Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0
Stadium III	T1-T2, N1, M0 T3-T4 N0-N1, M0
Stadium IV	Tx, Nx, M1
	T1 ≤ 5 cm T2 ≥ 5 cm T3: Tumorinvasion in Nachbargewebe ohne Infiltration von Nachbarorganen T4: Tumorinfiltration in Nachbarorgane oder Tumor/Thrombus in der V. cava oder V. renalis N0: keine regionalen Lymphknotenmetastasen (LK) N1: regionale LK-Metastasen M0: keine Fernmetastasen M1: Fernmetastasen

Obwohl die Tumore durch verbesserte Diagnostik immer früher erkannt werden, liegt das 5-Jahres-Überleben nur zwischen 16 und 44 Prozent [168]. Wesentlich hängt die Prognose des Nebennierenkarzinoms vom Tumorstadium ab. Eine Auswertung von 478 Patienten des deutschen Nebennierenkarzinomregisters ergab 5-Jahres-Überlebensraten von 84% im Stadium I, 63% im Stadium II, 51% im Stadium III und 15% im Stadium IV [169]. Bei metastasierten Nebennierenkarzinomen beträgt das mediane Überleben nach Diagnosestellung weniger als 12 Monate. Alter oder Geschlecht scheinen für die Prognose keine Rolle zu spielen [170; 171; 172; 173].

Mit einer schlechteren Prognose assoziiert, und damit auch als Prognosefaktoren geeignet, sind eine hohe Mitoserate, atypische Mitosen, ein hoher Ki67-Index, ein Hinweis für eine TP53-Mutation, der Nachweis einer Gefäßinvasion, Nekrosen sowie die Größe des Primärtumors über 12 cm [171; 174; 175].

1.4.2.2 Pathogenese des Nebennierenrindencarzinoms

Die Pathogenese von Nebennierenkarzinomen ist nach wie vor weitgehend ungeklärt [176]. Eine klassische Entwicklung aus einer Adenom-Karzinom-Sequenz, wie zum Beispiel beim Kolonkarzinom, wurde in Einzelfällen gezeigt,

ist jedoch in prospektiven Studien, in denen Inzidentalome über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden, nicht gesehen worden [168; 176; 177]. Bei einigen hereditären Syndromen besteht ein erhöhtes Risiko an einem Nebennierenkarzinom zu erkranken, sodass sich aus molekularen Ergebnissen einige Erkenntnisse über die Pathogenese ableiten lassen. Beim Li-Fraumeni-Syndrom kommt es zu einer Mutation auf dem Locus 17p13, auf dem das p53 Tumorsuppressorgen lokalisiert ist [176; 178]. Wird das 2. Allel des p53 Tumorsuppressorgens durch eine Mutation inaktiviert, ist die Funktion komplett unterdrückt [179]. In neueren Studien wurde mittels Arrays zur Bestimmung von Single Nucleotid-Polymorphismen gezeigt, dass ein deutlicher Unterschied in den Aberrationen zwischen Adenomen und Karzinomen besteht. In der Studie von Ronchi et al. zeigte sich die Alteration von 11p15.5 mit einer Überexpression von IGF2 als frühe Alteration in einer mehrstufigen Kanzerogenese [176]. In einer ganz aktuellen Arbeit des ENSAT-Netzwerks wurden mittels Genom-Sequenzierung zahlreiche neue Mutationen entdeckt, deren genaue Bedeutung jetzt allerdings noch aufgeklärt werden muss [176].

1.4.2.3 Therapieoptionen des Nebennierenrindenkarzinoms

Der bisher einzige sinnvolle kurative Therapieansatz ist eine radikale Adrenalectomie. Trotzdem kommt es bei bis ca. 80 Prozent der Patienten zu einem Tumorrezidiv [180].

Der Goldstandard für die adjuvante Therapie nach einer R0-Resektion ist nach aktuellem Forschungsstand Mitotane [180; 181]. Je nach Proliferationsindex (Ki67) besteht ein unterschiedlich hohes Risiko für ein Tumorrezidiv. Hier kann bei einem niedrigen Proliferationsindex aktuell im Rahmen einer Studie eine Mitotane-Gabe erwogen werden [180; 181].

Bei einer R1- oder Rx-Resektion steht die Strahlentherapie zusätzlich zur Mitotane-Therapie zur Verfügung [180]. Durch die Bestrahlung des Tumorbettes wird die Lokalrezidivrate gesenkt, sie hat jedoch weder einen Einfluss auf das Gesamtüberleben noch auf das krankheitsfreie Intervall [180; 182; 183]. Im Falle einer R2-Resektion besteht in Einzelfällen die Indikation zu einer Nachresektion [180].

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es wenige Daten für eine optimale Therapie beim Auftreten eines Tumorrezidivs. Tritt ein Rezidiv früh auf (in weniger als 6 Monaten), sollte die Chemotherapie gewählt werden, tritt ein Rezidiv später auf (nach 12 Monaten), sollten zunächst chirurgische Maßnahmen mit dem Ziel einer kompletten Resektion ergriffen werden und der Patient anschließend weiterhin mit Mitotane behandelt werden. Ist der Tumor inoperabel, kann eine Bestrahlung oder eine Chemoembolisation erwogen werden [181].

Beim fortgeschrittenen Nebennierenkarzinom ist nach aktuellem Forschungsstand die first-line-Therapie eine Kombination aus Mitotane, Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin [181]. Kommt es unter dieser Therapie zu einem Tumorprogress, sollten andere Chemotherapeutika eingesetzt werden.

Andere Chemotherapeutika, vor allem Stoffe für die sogenannte "Targeted Therapy", und deren Wirkung auf das Nebennierenkarzinom werden in aktuellen Studien untersucht. Bei einer Kombination eines IGF-R1-Antikörpers (Cixutumumab) und eines mTOR-Inhibitors (Temozolimumab) zeigte sich bei 42% der Patienten mit fortgeschrittenem Nebennierenkarzinom nach 6 Monaten eine stable disease. Mäßige Erfolge zeigten Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib (progressionsfreies Überleben in 14,3% der therapierten Patienten) oder Dovitinib (progressionsfreies Überleben in 23% der therapierten Patienten). VEGF-Antikörper zeigten trotz hoher Expression von VEGF-Rezeptoren bei Nebennierenkarzinomen kein Ansprechen [181]. Die Wirkung der "Targeted Therapy" auf das Nebennierenkarzinom ist sehr unterschiedlich. Auch aus diesem Grund werden neue Therapieansätze für das Nebennierenkarzinom benötigt.

2 Fragestellungen der Arbeit

Das Nebennierenkarzinom ist ein seltener Tumor, der häufig Glukokortikoide sezerniert und regelhaft mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

Seit ca. 60 Jahren ist bekannt, dass das Immunsystem bei der Kontrolle von Tumoren eine Rolle spielt. Bei zahlreichen Malignomen konnte gezeigt werden, dass hierbei T-Zellen von besonderer Bedeutung sind. Bei einzelnen Tumoren kommt es beispielsweise zu einer Induktion der regulatorischen T-Zellen (siehe 1.1.2.2.1), die dazu führt, dass die Tumore dem Immunsystem entgehen. Passend hierzu ist, dass bei diesen Erkrankungen die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Tumor bzw. im Blut mit einem kürzen Überleben der Patienten korreliert. Da mehrere Studien nahelegen, dass Glukokortikoide regulatorische T-Zellen induzieren, ist eine der Ausgangshypothesen dieser Arbeit, dass diese Subpopulation der T-Zellen beim Nebennierenkarzinom entscheidend zur schlechten Prognose beiträgt. Generell ist bisher allerdings sehr wenig zu Immunzellen (lokal und systemisch) beim Nebennierenkarzinom bekannt.

Daher ergaben sich folgende Fragen:

- 1) Unterscheidet sich die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Nebennierenkarzinom in Abhängigkeit vom Glukokortikoidexzess?**
- 2) Lassen sich regulatorische T-Zellen in besonderem Ausmaß in den Tumoren bei Nebennierenkarzinom-Patienten nachweisen bzw. wie ist das Immuninfiltrat dieser Tumore generell charakterisiert?**
- 3) Korreliert die Zahl der regulatorischen T-Zellen oder anderer Immunzellen im Tumor bzw. im peripheren Blut mit der Prognose der Patienten mit Nebennierenkarzinom?**

Um die Rolle der Glukokortioide auf die regulatorischen T-Zellen in vivo genauer zu untersuchen, wurden abschließend noch Untersuchungen an

gesunden Probanden bzw. Mäusen gemacht. Hierbei ging es konkret um die Frage:

4) Wie ist die Wirkung von (exogenen) Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen bei der Maus und bei immungesunden Menschen?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchung des peripheren Blutes auf regulatorische T-Zellen bei Patienten mit Nebennierenkarzinom

Das Blut von 231 Nebennierenkarzinompatienten wurde auf regulatorische T-Zellen in Abhängigkeit vom endogenen Steroidexzess untersucht. Gesunde tumorfreie Probanden stellten die Kontrollgruppe dar. Die Patienten wurden in 3 Gruppen(G) eingeteilt: G1: Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Tumor detektierbar war, G2: Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Tumor, jedoch kein Glukokortikoidexzess nachweisbar war, und G3: Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Tumor mit Glukokortikoidexzess nachweisbar war.

Den Patienten wurde 2,5 ml Blut zur Bestimmung eines großen Blutbildes (Gerinnungshemmer: EDTA) sowie 40 ml heparinisiertes Blut (5000 IE Heparin-Natrium, Fa. ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) entnommen und anschließend einer FACS-Untersuchung zugeführt.

3.2 Methodik

Die Arbeit mit den Immunzellen wurde in einer Sterilbank durchgeführt.

3.2.1 Gewinnung von Leukozyten

Das heparinisierte Blut wurde unmittelbar nach Abnahme 1:2 mit Phosphate buffer saline [PBS] (Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verdünnt und anschließend auf einen Ficoll-Hypaque-Gradienten (Ficoll-Paque™ PLUS, Fa. GE Healthcare Bio-Sciences AB, München, Deutschland) aufgebracht. Die Separation des Blutes erfolgte mittels Zentrifugation mit 1900 rpm für 30 Minuten. Daraus ergibt sich aufgrund der Dichteunterschiede eine charakteristische Schichtung (siehe Abbildung 2). Dabei darf die Zentrifuge nicht zu abrupt abbremsen, da dabei diese charakteristische Schichtung zerstört werden würde. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Plasmas und den darin enthaltenen Thrombozyten wurde der Zellring der peripheren mononukleären Blutzellen [PBMC] und der Monozyten geerntet. Anschließend

wurde das restliche Plasma mit dem überschüssigen Ficoll-Medium durch 2-maliges Waschen mit PBS entfernt.

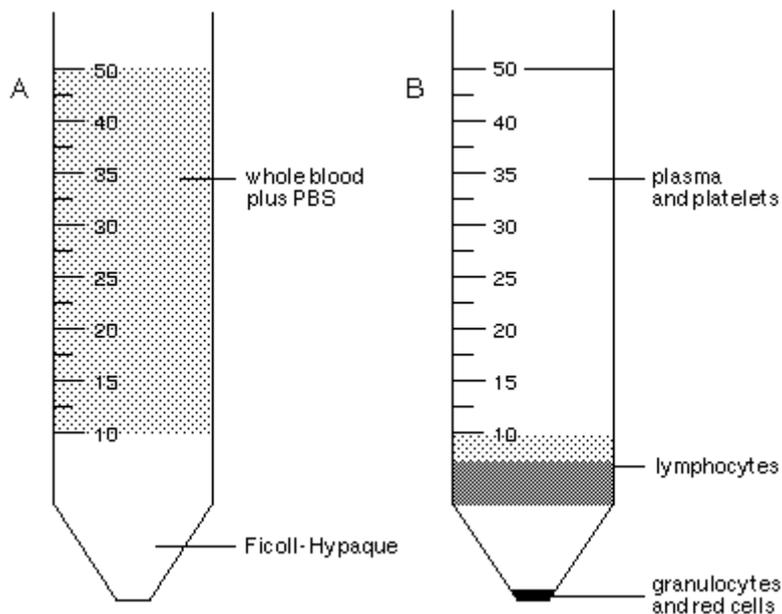


Abbildung 2: Ficoll-Gradient; links vor Zentrifugation: das mit PBS verdünnte Blut auf den Ficoll-Gradient aufgetragen; rechts nach Zentrifugation: die Erythrozyten und Granulozyten haben sich am Boden abgesetzt, darüber das Ficoll-Medium, darüber befindet sich der Lympho- und Monozytenring darüber befinden sich das Plasma mit den Thrombozyten
aus <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/CB/cb0202/cb0202-fig-0001-1-full.gif>

3.2.2 Ermittlung der Zellzahl

Nach sorgfältigem Durchmischen der gewonnenen PBMC wurde in einem Safe-Lock Tube (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) die Anzahl der lebenden Zellen durch Zugabe einer Trypanblaulösung (Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) ermittelt. Trypanblau gelangt durch die Zellmembran toter Zellen, sodass diese unter dem Mikroskop blau erscheinen, lebendige Zellen weiß. 10 µl der Verdünnung wurden unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in 4 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{(\text{Mittelwert der lebenden Zellen pro Quadranten}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Volumen in ml}}$$

3.2.3 Oberflächenfärbung

Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen in Foetal Bovine Serum [FBS] (Fa. Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) suspendiert und in 6 vorher beschriftete FACS-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland) eingegeben. Anschließend wurde 0,5 ml Stain-Buffer (PBS / 0,2 % Bovine Serum Albumin / 0,09 % SODIUM AZIDE NaN_3 , pH 7,4, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben und bei 1300 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgeschüttet. Als Waschschrift wird folgender Vorgang bezeichnet: Hinzugeben von Stain-Buffer, Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes. Anschließend wurde in jedes Röhrchen 250 µl Stain-Buffer hinzugegeben und die Sedimentation der Zellen resuspendiert. Im folgenden Schritt wurden die entsprechenden Antikörper, welche in Tabelle 2 ersichtlich sind, in sättigender Konzentration (lt. Anweisung der Firma) für eine Anzahl von jeweils 5×10^5 Zellen pro Röhrchen hinzupipettiert, vermischt und bei 4 °C inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation folgte ein Waschschrift mit jeweils 1 ml Stain-Buffer. Die Sedimente der Röhrchen Set 1, CTLA-4, CD127 und AITR wurden in 500 µl Stain-Buffer resuspendiert und am FACSCalibur[®] (Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Röhrchen für die FoxP3-Färbung und die Negativ-Kontrolle wurden der intrazellulären Färbeprozedur zugeführt.

3.2.4 Intrazelluläre Färbung

Die im Kapitel 3.2.3 beschriebenen Röhrchen für die intrazelluläre Färbung wurden einem erneuten Waschschrift unterzogen. Anschließend wurde dem bereits resuspendierten Zellpellet 0,5 ml einer Fixations- und Perforationslösung bestehend aus einer 1:4 Verdünnung von Fix Perm Concentrate (Cat. #00-5123-43) und Fix Perm Diluent (Cat. #00-5223-56) der Firma eBioscience (Frankfurt, Deutschland) hinzugegeben und für 30 bis 60 min bei 4 °C inkubiert. Diese Lösung fixiert die Antikörper auf der Oberfläche der Zellen und perforiert die Zellmembran. Nach der Inkubation wurde in jedes Set 1 ml Permeabilization-Buffer (Cat. #00-8333-56, Fa. eBioscience, Frankfurt, Deutschland, 1:10 mit PBS verdünnt) hinzupipettiert und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. So wird verhindert, dass sich die zuvor entstandenen

Perforationen der Zellmembran wieder verschließen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment resuspendiert, je 100 µl Permeabilization-Buffer sowie 2 µl „Normal rat“ (nicht immunogenes Rattenserum) zum Abfangen der unspezifischen Bindung hinzugefügt und die Röhren für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die entsprechenden Antikörper, welche in Tabelle 3 ersichtlich sind, in sättigender Konzentration hinzupipettiert, vermischt und die Röhren für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der intrazellulären Färbung erfolgten 3 Waschschrte mit jeweils 1 ml Permeabilization-Buffer. Nach Beendigung des Färbeprozesses wurde in jedes Röhren 500 µl Stain-Buffer zugegeben, das Zellsediment resuspendiert und am FACSCalibur[®] (Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper der Oberflächenfärbung

Set	Antigen/Klon	Konjugation	Hersteller
Set 1	CD3 (555335)	APC	BD Pharmingen™
	CD19 (555413)	PE	BD Pharmingen™
	CD14 (555397)	FITC	BD Pharmingen™
CTLA-4	CD25 (555431)	FITC	BD Pharmingen™
	CTLA-4 (555853)	PE	BD Pharmingen™
	CD8 (345775)	APC	Becton Dickinson™
AITR	CD4 (555347)	PE	BD Pharmingen™
	CD25 (555431)	FITC	BD Pharmingen™
	AITR/eBioAITR	APC	eBioscience™
CD127	CD4 (555347)	PE	BD Pharmingen™
	CD25 (555431)	FITC	BD Pharmingen™
	CD127 (558598)	Alexa Flour [®] 647	BD Pharmingen™
FoxP3	CD4/CD25 Cocktail /RPA-T4/BC96	FITC/APC	eBioscience™
Negativ-Kontrolle	-	-	-

Tabelle 3: Verwendete Antikörper der intrazellulären Färbung

Set	Antigen/Klon	Konjugation	Hersteller
FoxP3	Anti-FoxP3 / PCH101	PE	eBioscience™
Negativ-Kontrolle	Rat IgG2a Isotype Control / eBR2a	PE	eBioscience™

3.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem Zellen analysiert werden. Das Prinzip basiert auf der Emission, welche die Zelle beim Passieren eines Laserstrahles erzeugt. Diese Emissionen jeder Zelle werden von Detektoren ausgewertet. So erhält man quantitative Informationen über jede Zelle der Population: zum einen werden bei der Durchflusszytometrie die Größe („forward scatter“) und die Granularität („side scatter“) der Zellen, zum anderen Farbfluoreszenz von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern auf oder in der Zelle erfasst. Aufgrund der Darstellung von Größe und Granularität der Zellen, ist eine Aussage über den Überlebenszustand der erfassten Zellen möglich. Die Fluoreszenz der verschiedenen Marker wurde in FACS-Calibur[®] (Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) gemessen und die gewonnenen FACS-Daten mit der Cell Quest[®]-Software (Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für Apple-Macintosh ausgewertet.

3.2.6 Ermittlung der Absolutzahlen der Zellen

Die Leukozytenzahlen zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurden zunächst über das Zentrallabor der Universitätsklinik mittels eines Differentialblutbildes bestimmt. Anschließend wurde die in 3.2.3 und 3.2.4 beschriebene Färbeprozedur durchgeführt. Die Absolutzahlen der Zelllinien wurden über die ermittelten prozentualen Werte der Durchflusszytometrie (s. 3.2.5) über die folgende Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl einer Subpopulation} = \frac{\text{Gesamtzahl PBMC} * \text{mittels FACS ermittelter Prozentwert der Subpopulation}}{100}$$

Die Anzahl der PBMCs wurde aus dem parallel entnommenen großen Blutbild im Zentrallabor der Uniklinik Würzburg wie folgt berechnet:

$$\text{PBMC} = \text{Lymphozyten} + \text{Monozyten}$$

3.3 Immunhistologische Methoden

Intraoperativ gewonnene Tumorproben und Lymphknotenmetastasen von Patienten aus dem Deutschen Nebennierenkarzinom-Register wurden zur weiteren Aufarbeitung zunächst in das Pathologische Institut der Universitätsklinik Würzburg oder der jeweils zuständigen Pathologie verbracht

und in Paraffin gebettet. Als Positivkontrolle der immunologischen Färbungen fungierte Gewebe aus menschlichen Tonsillen, als Positivkontrolle für CD209 positive dendritische Zellen wurde Uterusgewebe verwendet.

3.3.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Die in Paraffin gebetteten Gewebelöcke wurden für 60 min bei -20°C gekühlt. Anschließend wurden an einem Mikrotom Hn 40 (Fa. Jung, Heidelberg, Deutschland) 2 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Im weiteren Arbeitsschritt wurden die Schnitte in einem Wasserbad bei ca. 50 °C auf einen Objektträger (Objektträger SuperFrost Plus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgetragen, getrocknet und danach an einem trockenen Ort aufbewahrt.

3.3.2 Färbung der Paraffinschnitte mit Antikörpern

Über folgende absteigende Alkoholreihe wurde das Paraffin entfernt:

Xylol 100 % 2 x 12 min

Ethanol 100 %

Ethanol 90 %

Ethanol 80 %

Ethanol 70 %

Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte in einem Dampfdrucktopf mit einem 10 mikromolaren Citratpuffer (Na-Citrat, pH 6,0) für 13 Minuten gekocht. Die Schnitte, welche für die FoxP3-Färbung bestimmt waren, wurden zusätzlich mit einer Target Retrieval Solution (Fa. Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) im Dampfdrucktopf gekocht. Nach dem Kochen wurden die Schnitte dreimalig mit destilliertem Wasser und zweimalig mit 0,01 molarem Tris/NaCl-Puffer (12,1 g Tris, 90 g NaCl, 10 l Aqua dest., pH 7,6) gewaschen. Um eine unspezifische Bindung zu verhindern, wurde das Gewebe mit humanem Serum der Blutgruppe AB für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Färbung der Gewebeschnitte mit den Primärantikörpern (s. Tabelle 4 und 5), welche wie in Tabelle 5 aufgeführter Konzentration in Antikörper-Diluent (Fa. Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) verdünnt wurden. Für eine Stunde und bei

Raumtemperatur erfolgte die Inkubation in einer feuchten Kammer. Es folgten 3 Waschschrte über jeweils 5 Minuten in 0,01 molarem Tris/NaCl-Puffer. Nun wurden die Gewebeschnitte mit Sekundärantikörpern (s. Tabelle 6) für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Darauf folgten erneut 3 Waschschrte mit 0,01 molarem Tris/NaCl-Puffer und eine DAPI-Zellkernfärbung mit Vectashield (Fa. Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010 U.S.A.)

Tabelle 4: Verwendete Primär-Antikörperkombinationen der immunhistochemischen Färbungen

Set	Kombination
1	CD3 + CD4
2	CD3 + CD8
3	CD3 + FoxP3
4	CD19 + CD209
5	Mouse universal negative control

Tabelle 5: Verwendete Primär-Antikörperpaare der immunhistochemischen Färbungen

Primär-Antikörper/Klon	Konzentration	Isotyp/Ursprung	Hersteller
CD3 / UCHT1	1 : 200	IgG / Hase	Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark
CD4 / 1F6	1 : 5	IgG / Maus	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK
CD8 / C8/144B	1 : 100	IgG / Maus	Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark
FoxP3 / 236A/E7	1:2	IgG / Maus	Abcam plc, Cambridge, UK
CD19 / LE-CD19	1:2	IgG / Maus	Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark
CD209 (DC-SIGN)	1 : 50	IgG / Hase	Abcam plc, Cambridge, UK
Mouse universal Negative-Control	Unverdünnt	Ig G1, G2a, G2b, G3, M Maus	Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark

Tabelle 6: Verwendete Sekundär-Antikörper bei den immunhistochemischen Färbungen

Sekundär-Antikörper	Isotyp/Ursprung	Konzentration	Konjugation	Hersteller
Anti-Hase	IgG / Esel	1 : 100	Cy3	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Maus	IgG / Esel	1 : 400	Alexa Fluor 488	MoBiTec Göttingen, Deutschland

3.3.3 Messung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Es wurden 10 repräsentative Bilder aus verschiedenen Regionen mit einem Immuninfiltrat der Tumorschnitte mittels eines 60-fach Öl-Immersionsobjektivs eines Axiovert 135 Mikroskops der Firma Carl Zeiss und einer Axioacam MRm Videokamera über das Programm Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy Browser (Version 4.0, Carl Zeiss, Deutschland) erstellt. Die Bilder wurden mit dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, NIH, USA) ausgewertet und ein Mittelwert errechnet (Bilder pro HighPowerField (hpf)).

Die statistischen Auswertungen sowie grafische Darstellungen erfolgten mit den Programmen EXCEL (Microsoft Office, USA) und Prism (Version 5.0a, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3.4 Die Wirkung von Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen bei Mäusen

Die Experimente mit den Mäusen wurden am Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universitätsmedizin Göttingen durch die Arbeitsgruppe von Reichardt nach den üblichen ethischen Standards und nach Genehmigung durch die Behörden des Landes Niedersachsen durchgeführt.

3.4.1 Mauslinien und Versuchsaufbau

Verwendet wurden Mäuse der Linie C57Bl/6 aus der Tierzucht der Universität Göttingen. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet,

das Alter betrug 8 bis 12 Wochen. Gehalten wurden die Mäuse in separat ventilierten Käfigen in einer keimfreien Umgebung. Die Blutentnahme erfolgte über Einstiche am Schwanz der Mäuse, oder direkt aus dem Herz, nachdem die Mäuse mittels Kohlenstoffdioxid getötet wurden. Außerdem wurden Immunzellen aus den Milzen der Mäuse gewonnen.

Ähnlich dem Glukokortikoidschema der Hörsturzpatienten (siehe Seite 35) und anderer Therapieschemata bei Autoimmunerkrankungen wurden den Mäusen zunächst an drei aufeinander folgenden Tagen Dexamethason intraperitoneal (i. p.) verabreicht[184; 185]. Der Versuchsaufbau wurde so angepasst um Unterschiede bezogen auf die Pharmakokinetik und die Handhabung von Glukokortikoiden zwischen Mäusen und Menschen untersuchen zu können[186; 187]. Im Gegensatz zum Glukokortikoidschema der Hörsturzpatienten (siehe Seite 35) wurde aufgrund des etablierten Versuchsmodells bei Mäusen sowohl die Applikationsart des Glukokortikoids als auch das Glukokortikoid selbst gewechselt.

Es wurden verschiedene Kohorten gebildet, welche sich durch die Dosierung des Dexamethasons unterschieden (i. p. pro Kilogramm Körpergewicht; Dexamethason, Fa. ratiopharm, Ulm, Deutschland):

Kohorte 1: 0,8 mg

Kohorte 2: 4 mg

Kohorte 3: 20 mg

Kohorte 4: 100 mg

Die Kohorte 4 erhielt zusätzlich eine 11-tägige orale Applikation von löslichem Dexamethason (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in folgender absteigender Dosierung über das Trinkwasser:

Tag 4-7: 10 mg/l p. o.

Tag 7-11: 5 mg/l p. o.

Tag 12-14: 1 mg/l p. o.

3.4.2 Gewinnung von Lymphozyten

Die unmittelbar nach Tötung der Mäuse entnommenen Milzen wurden durch Nylon-Siebe der Maschengröße 40 µm (Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) gerieben und anschließend in FACS-Puffer (PBS mit 0.5% BSA

und 0.05% NaN₃) aufgenommen. Die sich in der Milz befindlichen Erythrozyten wurden lysiert. Anschließend wurden die Lymphozyten gezählt.

Die Absolutzahl der Lymphozyten aus dem Blut wurde durchflusszytometrisch über eine definierte Menge Blut bestimmt.

3.4.3 Färbung der Zellen

Für die Färbung der Zellen wurden gegen mausspezifische Leukozytenantigene gerichtete Antikörper verwendet (s. Tabelle 7). Es wurden Antikörper mit direkt gekoppelten Fluoreszenzmolekülen (FITC, PE, PerCP, PE-Cy7, Cy5, APC, APC-Cy7) verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper der intra- und extrazellulären Färbung bei den Maus-Versuchen

Antigen/Klon	Hersteller
CD3 ε / 145-2C11	BD Pharmingen™
CD4 / RM4-5	BD Pharmingen™
CD8α / 53-6.7	BD Pharmingen™
CD25 / PC61	BD Pharmingen™
TCRαβ / H57-597	BD Pharmingen™
GR-1 / RB6-8C5	BD Pharmingen™
B220 / RA3-6B2	BD Pharmingen™
FoxP3 / FJK-16S	eBioscience™

3.4.4 Durchflusszytometrie

Die Analyse der gefärbten Lymphozyten erfolgte in FACS-Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und die gewonnenen FACS-Daten wurden mit FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA) ausgewertet.

3.5 Untersuchung des peripheren Blutes auf regulatorische T-Zellen immunologisch gesunder Patienten unter Glukokortikoidstoßtherapie

Es wurden 16 immunkompetente über 18-jährige Patienten aus der Würzburger Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenerkrankungen mit einem akuten Hörsturz, welche eine isolierte Glukokortikoidtherapie (modifiziertes Stennert-Schema) erhielten, in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren eine

Glukokortikoidtherapie in den letzten 8 Wochen vor Beginn des Stennert-Schemas, ein endogener Glukokortikoidexzess, eine maligne Erkrankung, eine Autoimmunkrankheit, eine anderweitige immunsuppressive Therapie oder das Vorliegen einer akuten oder chronischen Infektion. Zudem mussten andere Ursachen eines plötzlichen Hörverlustes wie Durchblutungsstörungen, Medikamente, toxische Substanzen, Nervenstörungen, Stoffwechselerkrankungen, Störungen des Flüssigkeits-Haushaltes der Cochlea, hormonelle Ursachen und Infektionen als organische Ursache des Hörverlustes ausgeschlossen werden.

Das reguläre Stennert-Schema enthält neben dem hochdosierten Glukokortikoid-Präparat zusätzliche Infusionen von Hydroxyethylstärke (HAES®) und Pentoxifyllin (Trental®). Da dies die Freisetzung von TNF- α sowie diverser anderer Interleukinen hemmt, wurde in unserer Studie bei den Probanden auf die Gabe von Pentoxifyllin verzichtet. Die Patienten bekamen folgendes Prednisolon-Schema verabreicht (s. Abbildung 3):

Tag 1-3: 250 mg/d i. v.

Tag 4: 150 mg/d i. v.

Tag 5-9: 100 mg/d p. o.

Tag 10-11: 75 mg/d p. o.

Tag 12: 50 mg/d p. o.

Tag 13: 20 mg/d p. o.

Tag 14: 10 mg/d p. o.

Die Blutentnahme erfolgte am ersten Tag unmittelbar vor Beginn der Infusionstherapie sowie 14 Tage nach der ersten Glukokortikoidgabe. Es wurde 2,5 ml Blut zur Bestimmung eines großen Blutbildes (Gerinnungshemmer: EDTA) sowie 40 ml heparinisiertes Blut (5000 IE Heparin-Natrium, Fa. ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) entnommen und anschließend einer FACS-Untersuchung zugeführt (s. Kapitel 3.2.1 bis 3.2.6).

Am Tag 14 wurde zusätzlich ein ACTH-Test durchgeführt, um die Funktion der Nebenniere zu überprüfen. Hierzu wurde eine Ampulle Synacthen (0,25 mg/ml Tetracosactid-hexaacetat, Novartis Pharma, Aulendorf, Deutschland) intravenös verabreicht und zum Zeitpunkt der Applikation sowie 60 Minuten später die

Konzentration des Serum-Kortisols durch das endokrinologische Routinelabor bestimmt.

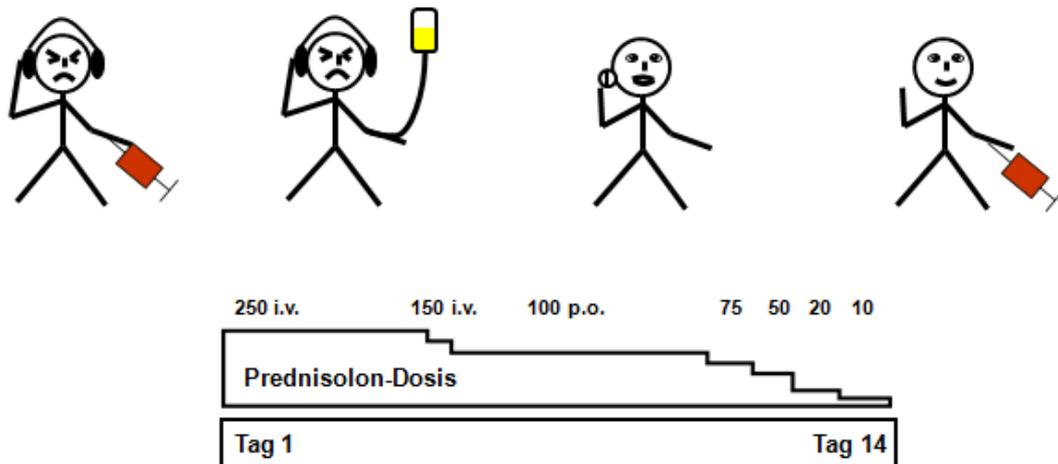


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufes und der Medikation der Glukokortikoidstudie, Applikationsform und Dosierungen in Milligramm

3.6 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichungen (\pm SD) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde eine ANOVA-Varianzanalyse gefolgt vom Bonferroni Vergleichstest durchgeführt. Alle Tests wurden mit der Software Prism (Version 5.0a für Macintosh, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) berechnet. Als statistisch signifikant wurden alle Werte, die kleiner als 5% sind, gesehen, das heißt der p-Wert ist kleiner 0,05.

Durch Kaplan-Meier-Kurven erfolgte die Darstellung der Überlebensanalysen. Mit Hilfe des Log rank-Tests wurden signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben (OS/ overall survival) dargestellt.

Nach Cox wurde die multivariate Überlebensstatistik unter Berücksichtigung der Zeit bis zum Ereignis Rezidiv oder Tod aus den angegebenen Einflüssen (Prediktoren) ein Score (Prognose-Index) berechnet. Patienten mit hohem Prognose-Index haben eine schlechte Prognose.

Zur Durchführung der Berechnungen wurden die Programme SPSS (Fa. IBM Corporation, Armonk, New York, USA) und Prism (Version 5.0a für Macintosh, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Nebennierenkarzinom

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit ACC untersucht. Die Mittelwerte der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen als Subpopulation der T-Helfer-Zellen der Tumorpatienten betragen in der Gruppe 1 (ACC-Patienten aktuell tumorfrei) 7,99 (\pm 6,1) %, in der Gruppe 2 (ACC-Patienten aktuell mit Tumor ohne Cortisolexzess) 9,0 (\pm 7,9) % und in der Gruppe 3 (ACC-Patienten aktuell mit Tumor und Cortisolexzess) 11,0 (\pm 7,8) % (s. Abbildung 4). In der Kontrollgruppe der gesunden Probanden betrug der Mittelwert der regulatorischen T-Zellen als Subpopulation der CD4 positiven T-Zellen 4,4 (\pm 1,2) %. Im Vergleich der einzelnen Gruppen in der Anova-Varianzanalyse (Dunn's Multiple Comparison Test) zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen 1 bis 3 (jeweils $p < 0,01$). Im Vergleich der einzelnen ACC-Gruppen stellte sich lediglich im Vergleich der Gruppe 1 (ohne Tumor) mit der Gruppe 3 (mit Cortisolexzess) ein signifikanter Unterschied dar ($p < 0,05$). Der Vergleich der Gruppe 1 mit 2 sowie der Gruppe 2 mit 3 brachte jeweils keinen signifikanten Unterschied zur Darstellung.

4.2 Assoziation zwischen peripheren Regulatorischen T-Zellen und der Prognose beim Nebennierenkarzinom

Wenn man versucht die Frequenz der regulatorischen T-Zellen mit dem Überleben der Patienten zu korrelieren, zeigt sich bei den Patienten ein schlechteres Überleben, bei denen höhere Anzahlen von zirkulierenden regulatorischen T-Zellen vorhanden waren. In der 1. Quartile zeigte sich ein mittleres Überleben von 39,3 Monaten, in der 2. Quartile 27,1 Monate, in der 3. Quartile 20,7 Monate und in der 4. Quartile ein mittleres Überleben von 19,9 Monaten (s. Abbildung 5). Auch in der univariaten Analyse zeigte sich im Vergleich der Anteile der regulatorischen T-Zellen über und unter dem Medianwert ein signifikant negativer Effekt auf das Überleben. Es zeigte sich eine mittlere Überlebenszeit von 33,3 Monaten im 1. und 2. Quartil, im 3. und 4.

Quartil hingegen eine Überlebenszeit von 21,7 Monaten. Die Hazard Ratio betrug hier 1,854 (95%-CI 1,088-3,158; $p=0,023$) (s. Abbildung 6).

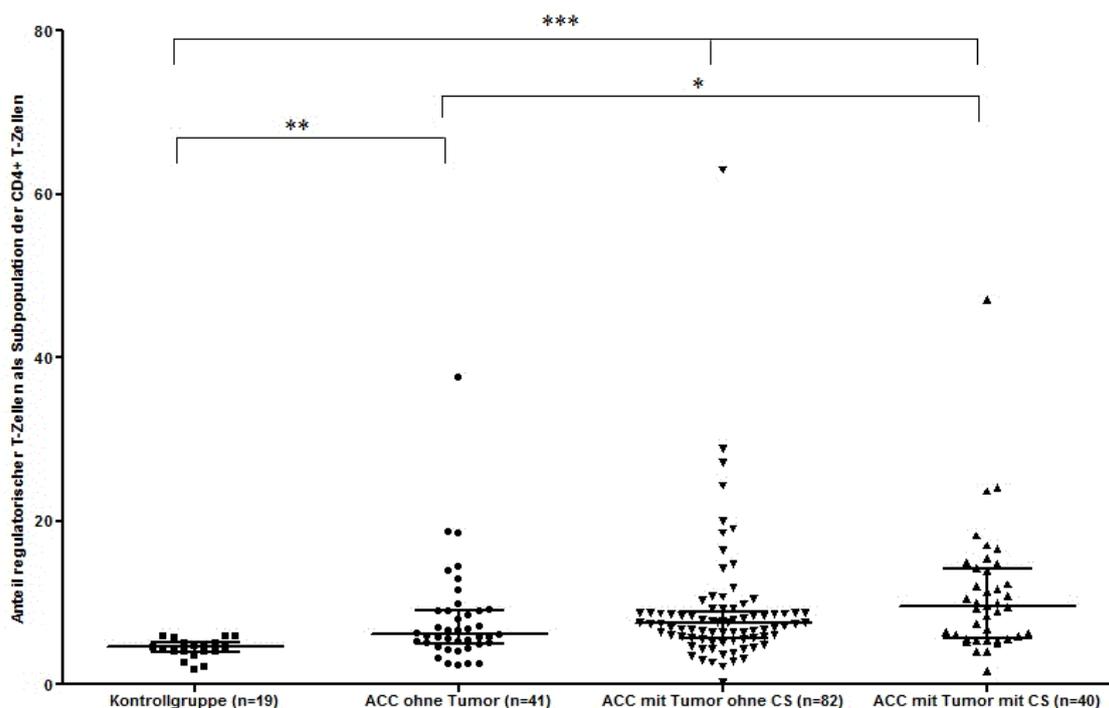


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Verteilung der regulatorischen T-Zellen bei Nebennierenkarzinompatienten (ACC) und der Kontrollgruppe gesunder Probanden; CS= Cushing Syndrom / tumorbedingter Cortisolexzess; Signifikanzniveau: $*$ = $p<0,05$; $**$ = $p<0,01$ $***$ = $p<0,001$

Adjustiert man die Ergebnisse in eine Multivariat-Analyse auf die Tumormasse und den Kortisolexzess waren diese nicht mehr signifikant. In den drei Tumorgruppen (s. Kapitel 3.1) zeigten sich folgende Unterschiede im Überleben: Patienten, die aktuell tumorfrei waren (G1), hatten ein mittleres Überleben von 37,1 Monaten, Patienten der Gruppe 2 ein mittleres Überleben von 21,2 Monaten (Hazard Ratio 5,7, 95%-CI 2,803-11,478, $p<0,001$) und Patienten der Gruppe 3 ein mittleres Überleben von 11,2 Monaten (Hazard Ratio 14,3, 95%-CI 6,841-29,746, $p<0,001$) (s. Abbildung 7).

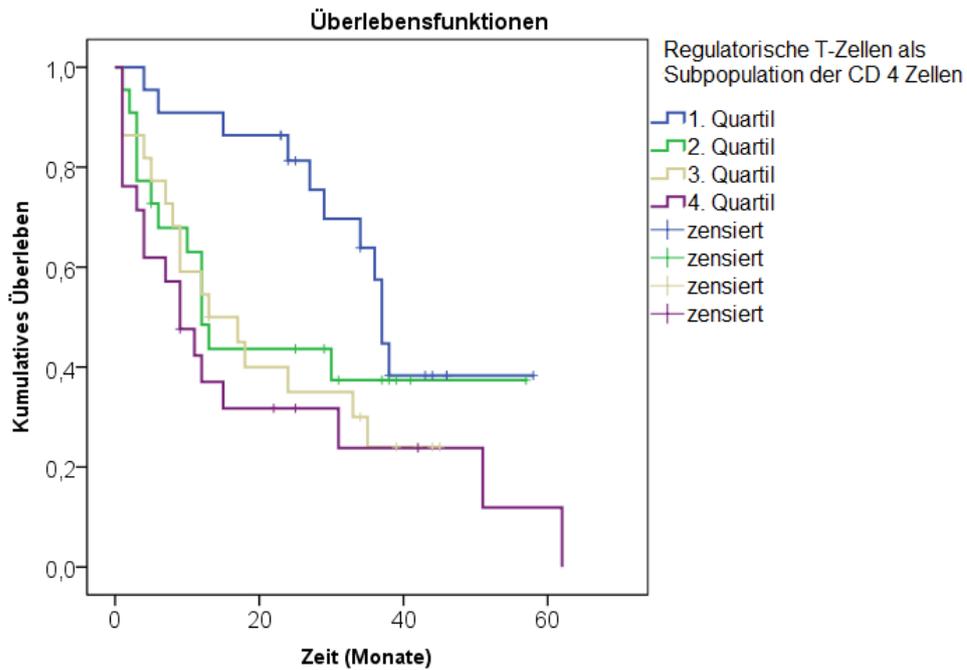


Abbildung 5: Überlebensraten in Abhängigkeit der Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut (Kaplan Meier)

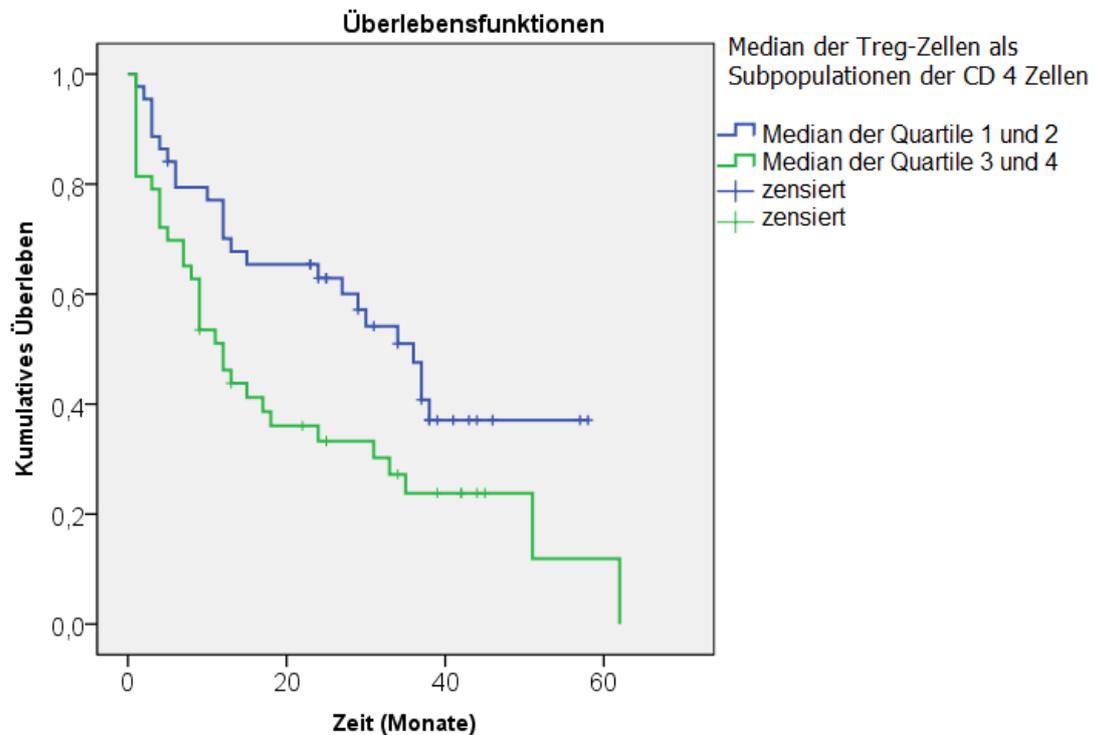


Abbildung 6: Überlebensraten in Abhängigkeit der Anzahl zirkulierender regulatorischer T-Zellen ($p=0,023$)

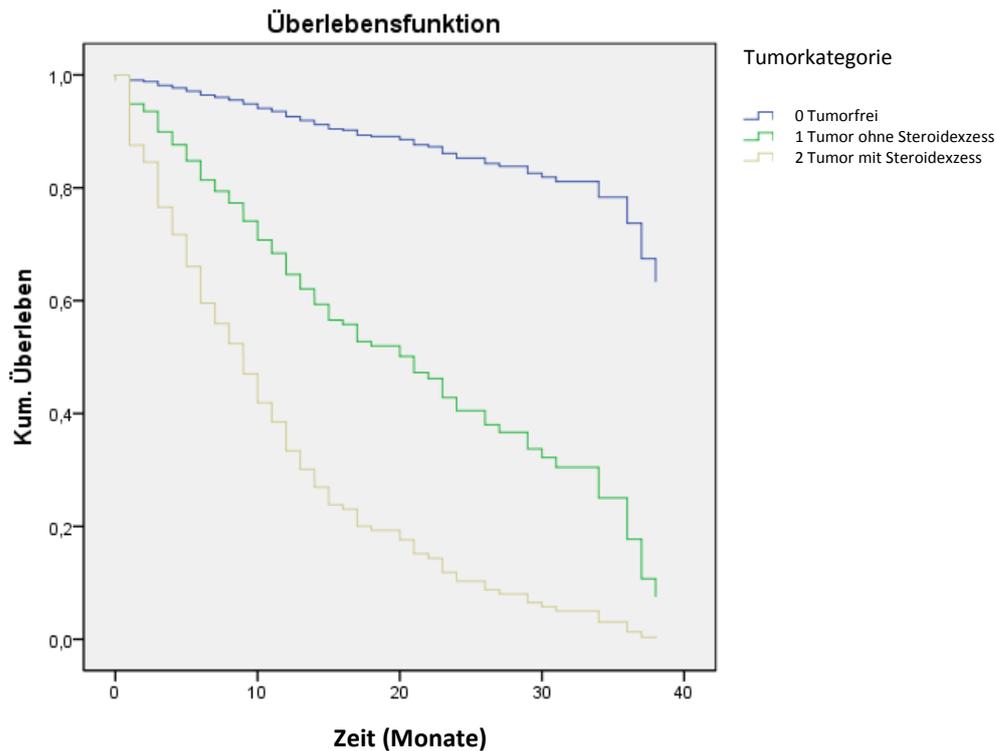


Abbildung 7: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Tumorstadiums und des Steroidexzesses

4.3 Tumor-Immunitrate beim Nebennierenkarzinom

Für die immunhistologische Aufarbeitung der Tumoruminfiltrate von Nebennierenkarzinomen wurden Primärtumore, Rezidivtumore und Metastasengewebe verwendet. Es wurden 63 Primär-, 7 Rezidivtumore und 11 Metastasen jeweils mit Antikörper gegen CD3, CD4, CD8 und FoxP3 gefärbt. Als Positivkontrolle diente Tonsillengewebe. Auf die Infiltration von CD19 positiven B-Zellen und CD209 positiven dendritischen Zellen wurden 29 Primär-, 5 Rezidivtumore und 7 Metastasen untersucht. Des Weiteren wurden 7 Nebennierenadenome auf Infiltration von Immunzellen analysiert. Als Positivkontrolle für die Färbungen CD3, CD4, CD8, CD19 und FoxP3 diente Tonsillengewebe, für die CD209-Färbung Uterusgewebe.

Die meisten Tumore zeigten eine Infiltration durch CD3, CD4, CD8, FoxP3 oder CD209 positive Immunzellen, wobei die Streuung sehr groß ist (s. Abbildungen 8-16, Tabelle 8). Weder bei den untersuchten Primärtumoren, noch

Rezidivtumoren oder Metastasen zeigte sich eine Infiltration des Tumorgewebes durch CD19 positive B-Zellen.

Auffällig war, dass bei den Färbungen CD3 und CD8 2 deutliche Ausreißer zu verzeichnen waren. Es handelte sich hier um eine bei Diagnosestellung 56-jährige Frau im Stadium ENSAT 2 ohne Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen und einen 72-jährigen Mann mit dem Tumorstadium ENSAT 4 mit Lymphknotenbefall und Fernmetastasen. Die Frau zeigte ein unauffälliges Hormonmuster und lebte 66,4 Monate nach Diagnosestellung noch. Zum Hormonstatus des Mannes ist nichts bekannt, er verstarb nach 12,3 Monaten.

Im Vergleich der Tumordinfiltrate von Metastasen, Primär-, Rezidivtumoren in einer Anova-Varianzanalyse (Dunn´s Multiple Comparison Test) zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

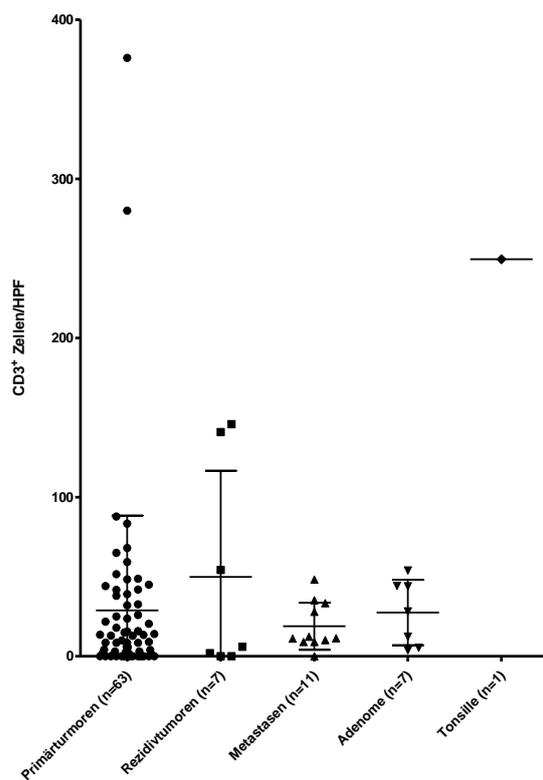


Abbildung 8: Anzahl der CD3 positiven T-Lymphozyten pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe

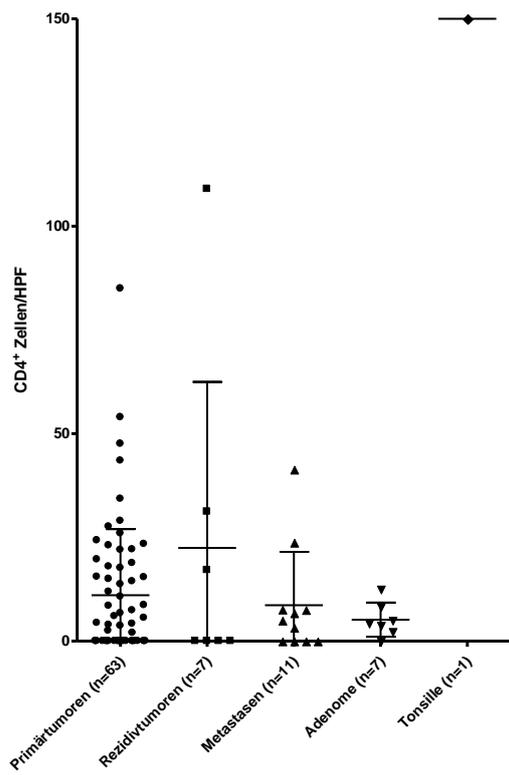


Abbildung 9: Anzahl der CD4 positiven T-Lymphozyten pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe

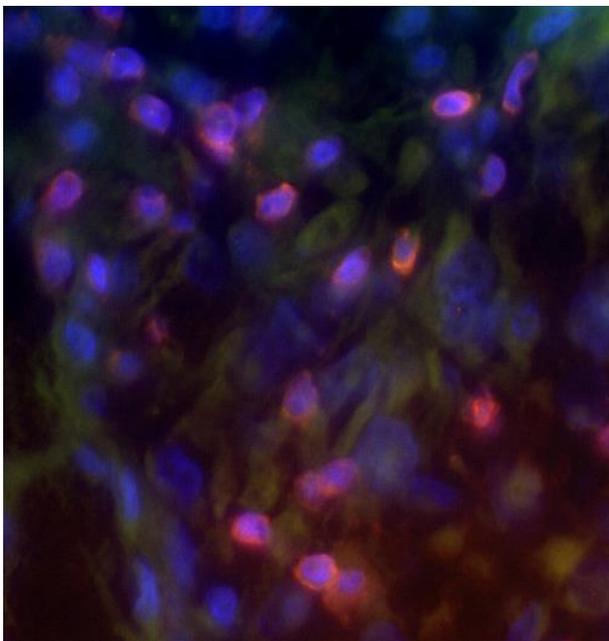


Abbildung 10: Immunhistologische Färbung von CD3 (rot) und CD4 (grün) positiven T-Zellen im Nebennierenrindencarcinom, Zellkerne blau

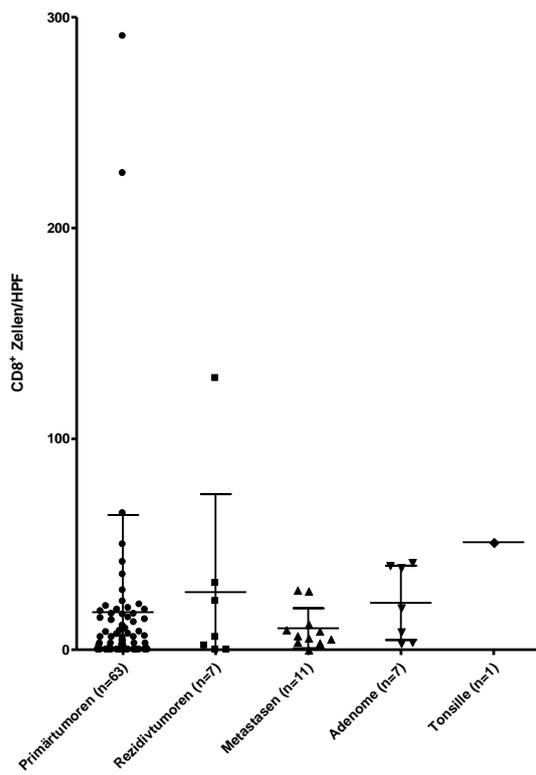


Abbildung 11: Anzahl der CD8 positiven T-Lymphozyten pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe

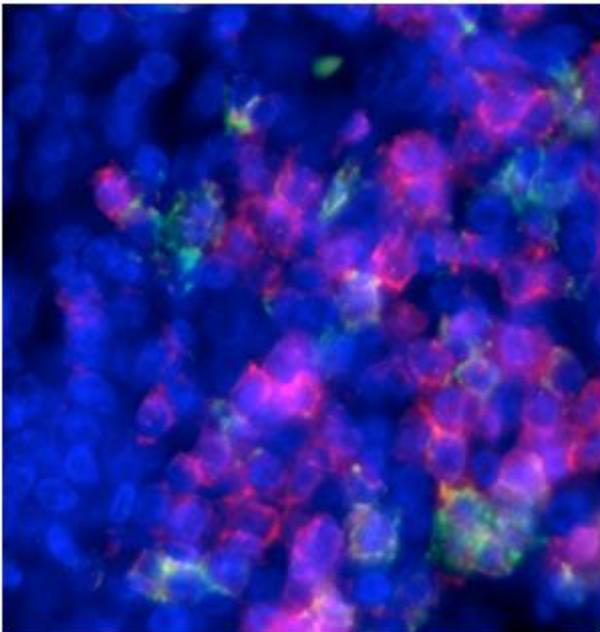


Abbildung 12: Immunhistologische Färbung von CD3 (rot) und CD8 (grün) positiven T-Zellen im Nebennierenrindenkarzinom, Zellkerne blau

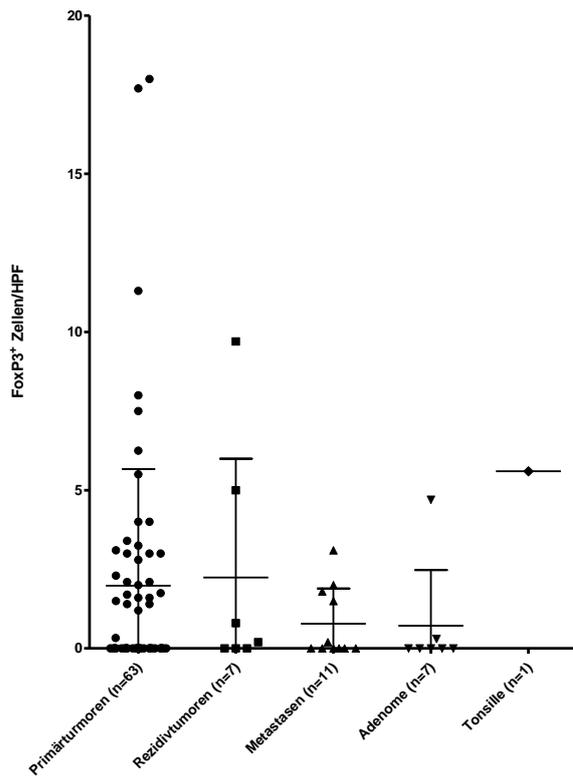


Abbildung 13: Anzahl der FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe

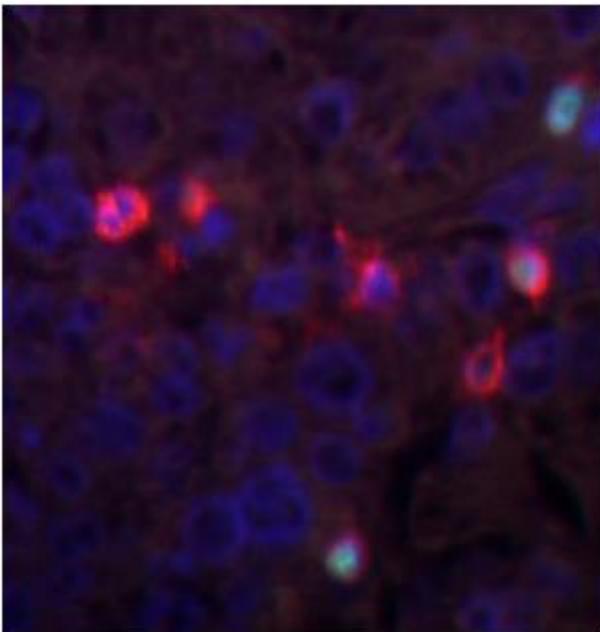


Abbildung 14: Immunhistologische Färbung von FoxP3 positiven (im Zellkern grüne Färbung), regulatorischen T-Zellen im Nebennierenrindencarzinom, rote Färbung entspricht dem Marker CD3, Zellkerne blau

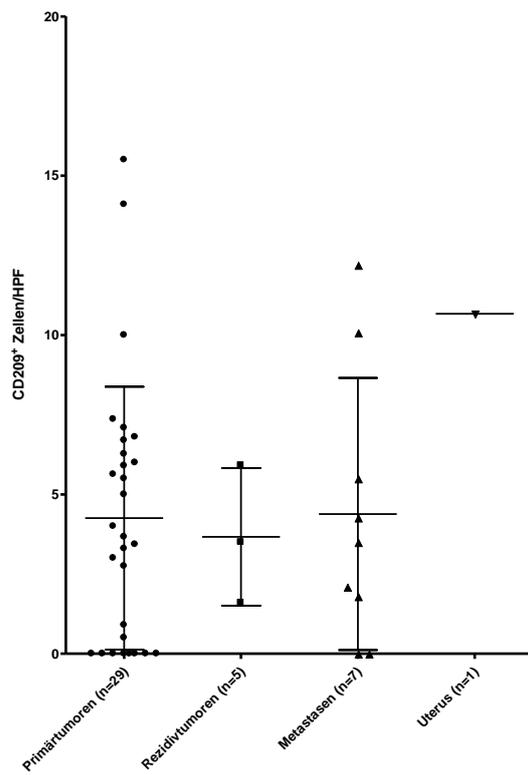


Abbildung 15: Anzahl der CD209 positiven dendritischen Zellen pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und ein Uterus als Kontrollgewebe

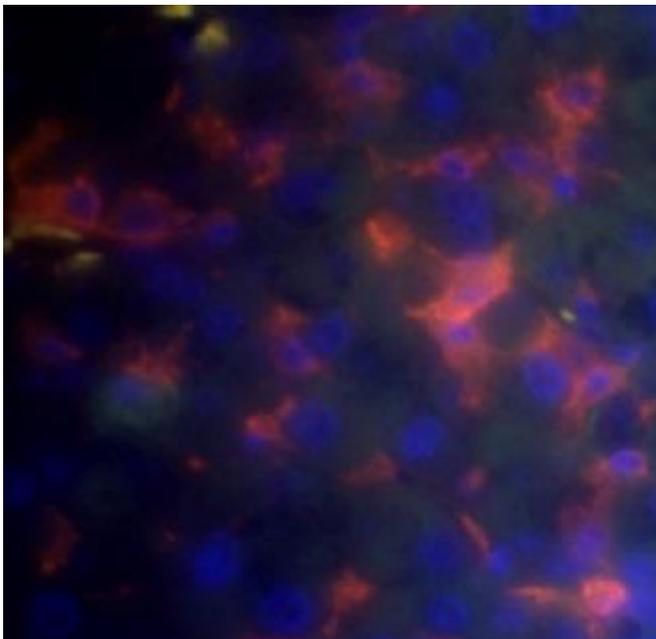


Abbildung 16: Immunhistologische Färbung von dendritischen Zellen im Nebennierenkarzinom, rote Färbung entspricht dem Marker CD209, Zellkerne blau, grün CD 19 (nicht vorhanden)

Tabelle 8 Anzahl der Immunzellen pro HPF bei Nebennierenkarzinom, Nebennierenadenomen bzw. Kontrollgewebe

Färbung	Gewebe	Mittelwert	SD	Median	Range
CD3	Primärtumor	28,86	59,5	12,9	0-376
	Rezidiv	49,87	66,73	6,0	0-145,9
	Metastase	18,89	14,86	11,35	0-48,2
	Adenom	27,47	20,54	28,3	3,9-54
	Tonsille	249,5	-	249,5	-
CD4	Primärtumor	11,05	15,98	4,2	0-85
	Rezidiv	22,47	44,03	0	0-109
	Metastase	8,69	12,84	5	0-41,4
	Adenom	5,17	4,11	4,3	0-12,5
	Tonsille	150	-	150	-
CD8	Primärtumor	17,8	46,12	6	0-291
	Rezidiv	27,36	46,41	6	0-128,8
	Metastase	10,2	9,51	6,8	0-28,45
	Adenom	22,27	17,65	20	3,1-41,5
	Tonsille	51	-	51	-
FoxP3	Primärtumor	1,98	3,69	0	0-18
	Rezidiv	2,24	3,75	0,2	0-9,7
	Metastase	0,78	1,11	0	0-3,1
	Adenom	0,71	1,76	0	0-4,7
	Tonsille	5,6	-	5,6	-
CD209	Primärtumor	4,26	4,13	3,67	0-15,5
	Rezidiv	3,67	2,16	3,5	1,6-5,91
	Metastase	4,38	4,27	3,5	0-12,2
	Uterus	10,67	-	10,67	-

4.4 Korrelation der Immuninfiltrate mit dem Gesamtüberleben

Da in Studien bei anderen Tumorentitäten ein Immuninfiltrat mit einem besseren Überleben korreliert, sollte auch bei den untersuchten Nebennierenkarzinomen festgestellt werden, ob ein Immuninfiltrat mit einem prognostisch besseren Überleben der Patienten korreliert.

4.4.1 Korrelation des T-Zell-Immuninfiltrats mit dem Gesamtüberleben

Korreliert man die Anzahl der tumorinfiltrierenden CD3 T-Zellen (eingeteilt nach Quartilen bzw. dem Median) mit dem Überleben, so zeigte sich bei keiner Gruppe ein signifikantes Ergebnis. Es zeigten sich jedoch im Vergleich zur 1. Quartile folgende Hazard Ratios bezüglich des Risikos "Tod": 2. Quartile: 0,403, 3. Quartile: 0,739 und 4. Quartile: 0,433. Wenn man die Gruppe beim Median der CD3 positiven Zellen schneidet, ergeben sich keinerlei Unterschiede (Hazard Ratio: 0,9). Die weiteren Zahlen (inklusive der Konfidenzintervalle) sind in Tabelle 9 wiedergegeben. Ähnliches zeigt sich bei der Analyse der CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen, bei denen in den verschiedenen Subgruppen keine signifikanten Unterschiede zu sehen waren. Wie in Tabelle 10 dargestellt, zeigte sich jedoch ein Trend, bei dem Patienten mit größeren Immuninfiltraten ein längeres medianes Überleben zeigten. Bei den T-Helfer-Zellen war ebenfalls ein Trend zu sehen (s. Tabelle 11 und Abbildung 17 A und B). Die Patienten mit sehr wenigen CD4 positiven Zellinfiltraten hatten ein deutlich kürzeres medianes Überleben: 21 Monate der 1. Quartile vs. > 60 Monate in den anderen Quartilen. Erstaunlicherweise spiegelte sich dieser Trend, wie in Tabelle 12 ersichtlich, auch bei Tumorinfiltration durch CD3 und FoxP3 positive T-Zellen wider: bei wenigen Immuninfiltraten stellte sich ein kürzeres medianes Überleben dar. Da das Überleben innerhalb der Gruppe heterogen war bzw. die Gruppengröße insgesamt zu klein war, war dieser Unterschied im Grundeffekt nicht signifikant.

4.4.2 Korrelation des Immuninfiltrats durch dendritische Zellen mit dem Gesamtüberleben

Korreliert man tumorinfiltrierende CD209 positive dendritische Zellen mit dem Gesamtüberleben eingeteilt nach Quartilen, zeigte sich in der 3. Quartile eine signifikante Hazard Ratio von 14,533 ($p=0,010$). Sonst ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Teilt man hier die Gruppe durch den Median zeigte sich eine signifikante Hazard Ratio der Quartilen 3+4 verglichen zu den Quartilen 1+2: 5,169 ($p=0,024$). Betrachtet man das mediane Überleben, so zeigt sich bei einem Immuninfiltrat durch CD 209 positive dendritische Zellen wie in Tabelle 13 und Abbildung 18 A und B dargestellt ein nahezu proportionaler, jedoch in der Gesamtheit nicht signifikanter Trend: Patienten, die ein größeres Immuninfiltrat aufwiesen, zeigten ein kürzeres Gesamtüberleben. Jedoch muss hier die geringe Fallzahl unbedingt beachtet werden.

Tabelle 9: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD3⁺ Zellen (n=58)

CD3 ⁺	Gesamtüberleben		Rezidiv-freies Überleben	
	HR (CI) für Tod	p-Wert	HR (CI) für Rezidiv	p-Wert
1. Quartil				
2. Quartil	0,40 (0,132-1,235)	0,112	0,31 (0,111-0,877)	0,027
3. Quartil	0,74 (0,301-1,818)	0,510	0,83 (0,361-1,913)	0,664
4. Quartil	0,43 (0,152-1,235)	0,118	0,74 (0,304-1,821)	0,517
Median	0,90 (0,447-1,823)	0,775	1,34 (0,706-2,558)	0,369
	Medianes Überleben in Mo.	p-Wert	Medianes Rezidiv-freies Überleben in Mo.	p-Wert
1. Quartil	21,0	0,154	8,9	0,734
2. Quartil	nicht definiert		24,1	
3. Quartil	39,5		10,1	
4. Quartil	61,7		8,8	
Median 1+2	38,1	0,906	10,7	0,920
Median 3+4	43,6		8,8	

Tabelle 10: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD8⁺ Zellen (n=58)

CD8 ⁺	Gesamtüberleben		Rezidiv-freies Überleben	
	HR (CI) für Tod	p-Wert	HR (CI) für Rezidiv	p-Wert
1. Quartil	Referenz		Referenz	
2. Quartil	0,99 (0,376-2,587)	0,978	0,39 (0,127-1,218)	0,108
3. Quartil	0,66 (0,270-1,597)	0,354	0,63 (0,293-1,371)	0,247
4. Quartil	0,67 (0,252-1,768)	0,416	0,67 (0,289-1,562)	0,356
Median	0,67 (0,330-1,337)	0,252	0,81 (0,423-1,559)	0,532
	Medianes Überleben in Mo.	p-Wert	Medianes Rezidiv-freies Überleben in Mo.	p-Wert
1. Quartil	29,1	0,339	8,9	0,385
2. Quartil	17,5		7,8	
3. Quartil	91,4		25,5	
4. Quartil	19,0		8,8	
Quartile 1+2	25,4	0,108	8,8	0,094
Quartile 3+4	81,8		19,2	

Tabelle 11: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD4⁺ Zellen (n=58)

CD4 ⁺	Gesamtüberleben		Rezidiv-freies Überleben	
	HR (CI) für Tod	p-Wert	HR (CI) für Rezidiv	p-Wert
1. Quartil	Referenz		Referenz	
2. Quartil	0,13 (0,015-1,201)	0,072	1,10 (0,283-4,274)	0,890
3. Quartil	0,42 (0,157-1,113)	0,081	1,33 (0,564-3,152)	0,512
4. Quartil	0,39 (0,141-1,069)	0,067	1,62 (0,688-3,796)	0,270
Median	0,63 (0,305-1,291)	0,205	1,43 (0,739-2,774)	0,288
	Medianes Überleben in Mo.	p-Wert	Medianes Rezidiv-freies Überleben in Mo.	p-Wert
1. Quartil	21,0	0,082	10,0	0,539
2. Quartil	nicht definiert		36,1	
3. Quartil	67,5		16,0	
4. Quartil	61,7		8,6	
Median 1+2	29,7	0,190	10,7	0,876
Median 3+4	61,7		8,8	

Tabelle 12: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD3⁺FoxP3⁺ Zellen (n=58)

CD3 ⁺ FoxP3 ⁺	Gesamtüberleben		Rezidiv-freies Überleben	
	HR (CI) für Tod	p-Wert	HR (CI) für Rezidiv	p-Wert
1. & 2. Quartil	Referenz		Referenz	
3. Quartil	0,72 (0,304-1,691)	0,447	1,68 (0,770-3,682)	0,191
4. Quartil	1,03 (0,432-2,443)	0,950	0,86 (0,365-2,041)	0,738
Median	0,85 (0,423-1,693)	0,637	1,22 (0,629-2,344)	0,562
	Medianes Überleben in Mo.	p-Wert	Medianes Rezidiv-freies Überleben in Mo.	p-Wert
1. & 2. Quartil	31,3	0,875	9,5	0,409
3. Quartil	61,7		9,4	
4. Quartil	81,8		16,6	
Median 1+2	31,3	0,665	9,5	0,667
Median 3+4	71,5		11,3	

Tabelle 13: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD209⁺ dendritische Zellen (n=28)

CD209 ⁺	Gesamtüberleben		Rezidiv-freies Überleben	
	HR (CI) für Tod	p-Wert	HR (CI) für Rezidiv	p-Wert
1. Quartil	Referenz		Referenz	
2. Quartil	1,85 (0,303-11,270)	0,508	0,64 (0,122-3,315)	0,591
3. Quartil	14,35 (1,895-108,679)	0,010	2,67 (0,480-14,789)	0,262
4. Quartil	2,47 (0,268-22,799)	0,425	2,34 (0,325-16,767)	0,399
Median	5,17 (1,237-21,593)	0,024	3,17 (0,987-10,173)	0,053
	Medianes Überleben in Mo.	p-Wert	Medianes Rezidiv-freies Überleben in Mo.	p-Wert
1. Quartil	109,6	0,556	9,5	0,47
2. Quartil	53,4		48,3	
3. Quartil	13,1		8,8	
4. Quartil	17,5		10,7	
Median 1+2	109,6	0,152	21,5	0,148
Median 3+4	16,9		9,4	

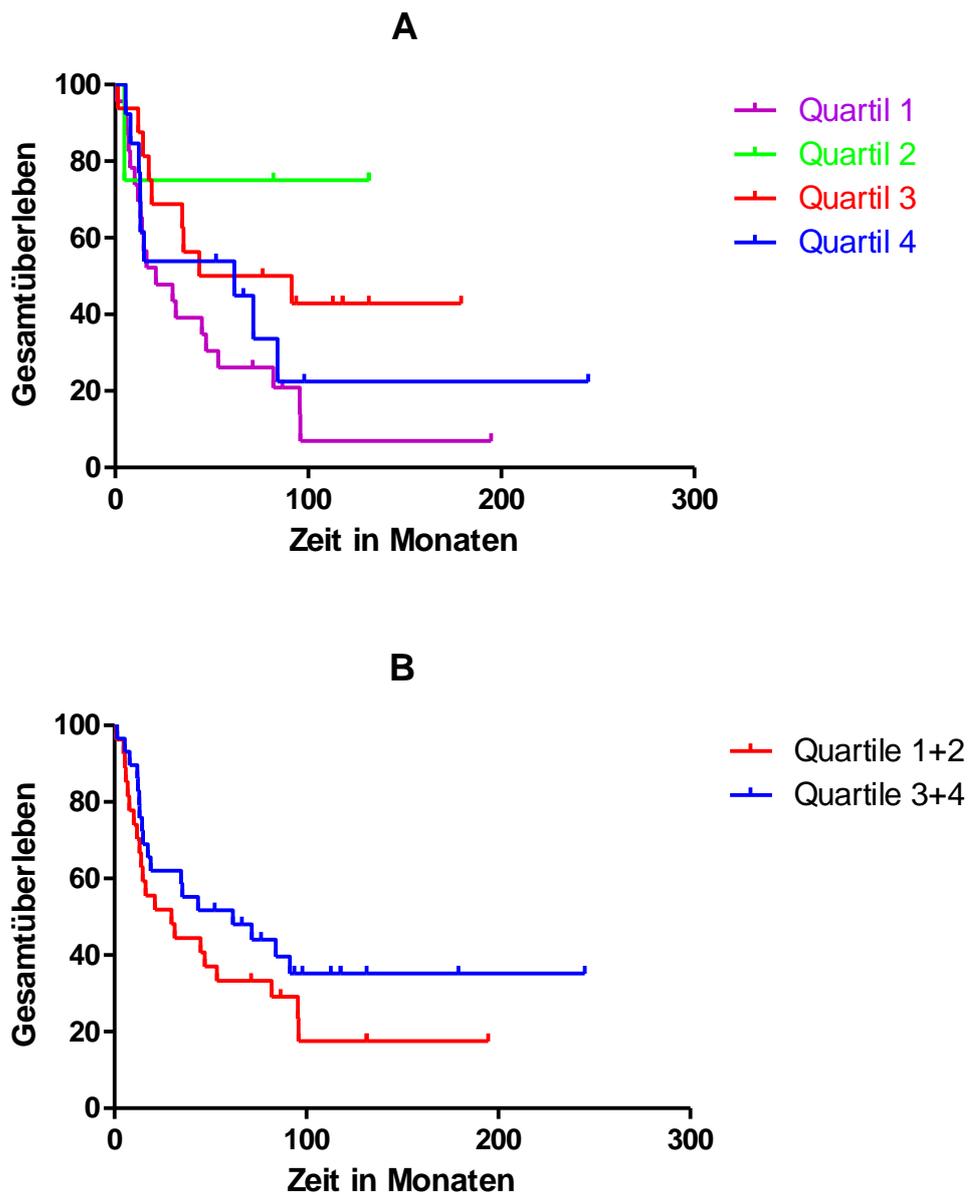


Abbildung 17: Mediane Überlebensraten in Abhängigkeit der Größe des Immunfiltrates durch CD4 positive T-Zellen (Kaplan Meier); A Darstellung der Quartile 1-4, B Gegenüberstellung der Quartile 1+2 und 3+4

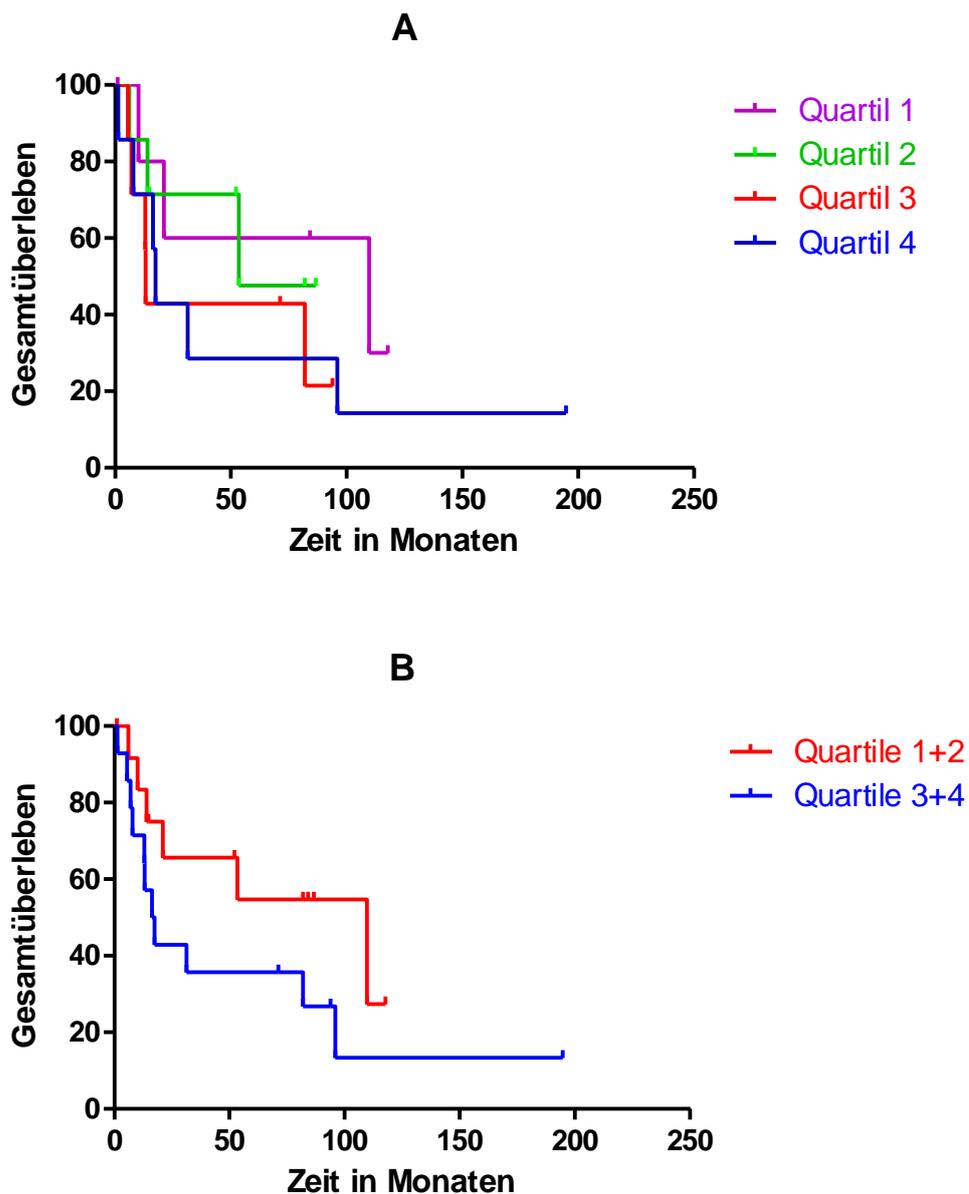


Abbildung 18: Mediane Überlebensraten in Abhängigkeit der Größe des Immuninfiltrates durch CD209 positive dendritische Zellen (Kaplan Meier); A Darstellung der Quartile 1-4, B Gegenüberstellung der Quartile 1+2 und 3+4

4.5 Korrelationen der Immuninfiltrate mit dem Rezidiv-freien Überleben

Da in vorhergegangenen Studien anderer Tumorentitäten ein Immuninfiltrat nicht nur das Gesamtüberleben, sondern auch das Rezidiv-freie Überleben beeinflussen kann, wurde im Folgenden untersucht, ob bei

Nebennierenkarzinomen ein Immuninfiltrat mit dem Rezidiv-freien Überleben korreliert.

4.5.1 Korrelation des T-Zell-Immuninfiltrats mit dem Rezidiv-freien Überleben

Korreliert man die Anzahl der tumorinfiltrierenden CD3 T-Zellen (eingeteilt nach Quartilen bzw. dem Median) mit dem Überleben, so zeigte sich bei keiner Gruppe ein signifikantes Ergebnis. Es zeigten sich jedoch im Vergleich zur 1. Quartile folgende Hazard Ratios bezüglich des Risikos "Rezidiv": 2. Quartile: 0,31, 3. Quartile: 0,83 und 4. Quartil: 0,74. Wenn man die Gruppe beim Median der CD3-Zellen schneidet, ergeben sich keinerlei Unterschiede (Hazard Ratio: 1,34). Die weiteren Zahlen (inklusive der Konfidenzintervalle) sind in den Tabellen 9-13 wiedergegeben. Bei Betrachtung des medianen Rezidiv-freien Überlebens in Abhängigkeit eines Immuninfiltrats durch CD3 positive T-Zellen, zeigten sich keine Unterschiede in den Quartilen.

Ein leichter Trend zu einem längeren medianen Rezidiv-freien Überleben zeigte sich bei Patienten, deren Tumore eine größere Anzahl von CD8 positiven zytotoxischen T-Zellinfiltraten aufwiesen: 8,8 Monate der Quartilen 1+2 vs. 19,2 Monate der Quartilen 3+4. Analog zu den Daten des Gesamtüberlebens war das Rezidiv-freie Überleben innerhalb der Gruppe heterogen und die Gruppengröße insgesamt zu klein, sodass auch hier der Unterschied im Grundeffekt nicht signifikant war.

Eine größere Anzahl von Tumorimmuninfiltraten durch CD4 positive T-Helferzellen als auch durch CD3 und FoxP3 positive T-Zellen zeigte keinen Einfluss auf ein längeres Rezidiv-freies Überleben.

4.5.2 Korrelation des Immuninfiltrats durch dendritische Zellen mit dem Rezidiv-freien Überleben

Bei der Korrelation von tumorinfiltrierenden dendritischen Zellen mit dem Rezidiv-freien Überleben zeigte sich bei der geringen untersuchten Fallzahl ein leichter, aber nicht signifikanter Trend zu einem kürzeren medianen Rezidiv-freien Überleben, je weniger die Tumore durch dendritische Zellen infiltriert waren: Quartile 1+2 21,5 Monate vs. 9,4 Monate in den Quartilen 3+4. Die Hazard Ratios betragen im Vergleich zur ersten Quartile in der 2. Quartile 0,64, in der 3. Quartile 2,67 und in der 4. Quartile 2,34. Beim Median zeigte sich eine

Hazard-Ratio von 3,169 für das Rezidiv-freie Überleben durch Tumordinfiltration durch dendritische Zellen.

4.6 Einfluss von Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen in vivo

Da die ersten Ergebnisse der oben dargestellten Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen Glukokortikoid-Exzess und regulatorischen T-Zellen nahegelegt haben, wurden ab einem bestimmten Zeitpunkt der Arbeit parallel in-vivo Untersuchungen durchgeführt, um diesen Aspekt genauer zu beleuchten.

4.6.1 Einfluss von Glukokortikoiden auf Immunzellen im Mausmodell

4.6.1.1 Ergebnisse der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen

Die 3-tägige intraperitoneale Therapie mit Dexamethason führte zu einem dosisabhängigen Absinken der absoluten Anzahl der CD4 positiven Zellen im Blut (s. Tabelle 14). In der Kohorte 4 (100mg Dexamethason) verringerte sich nach der 3-tägigen Therapie die Anzahl der CD4⁺-Zellen signifikant auf unter 10 Prozent im Vergleich zu den Kontrolltieren ($37,3 \times 10^4 \pm 18,8 \times 10^4$ vs. $2,8 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$), welche keine Glukokortikoide erhielten. Nach der folgenden oralen Dexamethason-Applikation in der Kohorte 4 stieg die Anzahl der CD4 positiven Zellen leicht auf $6,3 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$. Ebenfalls sank die absolute Anzahl CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen dosisabhängig nach 3 Tagen intraperitonealer Dexamethasonapplikation. Auch war nach der 11-tägigen Anschluss therapie bei den regulatorischen T-Zellen ein leichter absoluter Anstieg zu verzeichnen ($0,07 \times 10^4 \pm 0,05 \times 10^4$ vs. $0,22 \times 10^4 \pm 0,12 \times 10^4$).

Tabelle 14: Absolut- und Prozentzahlen vor und nach Dexamethasongabe im Blut in Mäusen

	Tag 0	Nach 3 Tagen Dexamethasontherapie (i.p., in mg/kg)				Tag 14
		0,8	4	20	100	
CD4⁺ Zellen	37,3x10 ⁴ ±18,8x10 ⁴	26,6x10 ⁴ ±18,9x10 ⁴	18,8x10 ⁴ ±15,7x10 ⁴	14,2x10 ⁴ ±6,2x10 ⁴ *	2,8x10 ⁴ ±1,8x10 ⁴ **	6,3x10 ⁴ ±1,8x10 ⁴ ***
FoxP3⁺ Zellen[§]	2,6x10 ⁴ ±1,3x10 ⁴	1,3x10 ⁴ ±1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴ ±0,9x10 ⁴ *	0,3x10 ⁴ ±0,3x10 ⁴ ***	0,07x10 ⁴ ±0,05x10 ⁴ ***	0,22x10 ⁴ ±0,12x10 ⁴ ***
%FoxP3 Zellen[#]	7,2±1,4	4,8±0,8 **	5±0,7 *	3,1±1,7 ***	2,7±0,8 ***	2,9±0,7 ***

§ als Subpopulation der CD4⁺CD25^{high} Zellen, # als Prozent der CD4⁺ T-Zellen, ± Standardabweichung

Signifikanzniveau (Bonferroni's Multiple Comparison Test):

* p < 0,05 im Vergleich zu Tag 0; ** p < 0,01 im Vergleich zu Tag 0

*** p < 0,001 im Vergleich zu Tag 0

4.6.1.2 Ergebnisse der regulatorischen T-Zellen in der Milz

Im Vergleich zum Blut zeigte sich in den untersuchten Milzen der gleichen Mäuse ein etwas anderes Ergebnis (s. Tabelle 15, Abbildung 19). Nach der 3-tägigen intraperitonealen Dexamethasontherapie kam es in der Milz zu einem starken dosisabhängigen Abfall der CD4 positiven Zellen ($12,6 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^6$ in der Kontrollkohorte vs. $0,3 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ in der Kohorte 4). Im Unterschied zum peripheren Blut kam es in der Kohorte 4 nach der oralen Applikation zu einem Anstieg der absoluten Anzahl der CD4 positiven Zellen von $0,3 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ auf $3,0 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$ ($p < 0,01$). Auch bei den CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen kam es zu einem dosisabhängigen Abfall in der Kohorte 4, jedoch auch zu einer partiellen Erholung der Anzahl der regulatorischen T-Zellen nach oraler Glukokortikoidapplikation von $0,02 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$ auf $0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ ($p < 0,01$). Die relative Verteilung der regulatorischen T-Zellen als Subpopulation der CD4 positiven Zellen, zeigt nach 3-tägiger parenteraler Hochdosis-Therapie einen signifikanten Abfall, jedoch nach der

dosisreduzierten oralen Applikation zu einer signifikanten relativen Erholung ($p < 0,05$).

Tabelle 15: Absolut- und Prozentzahlen vor und nach Dexamethasongabe in der Milz in Mäusen

	Tag 0	Nach 3 Tagen Dexamethasontherapie (i.p., in mg/kg)				Tag 14
		0,8	4	20	100	
CD 4+ Zellen	12,6x10 ⁶ ±3,8x10 ⁶	6,0x10 ⁶ ±2,2x10 ⁶ ***	2,5x10 ⁶ ±1,6x10 ⁶ ***	1,6x10 ⁶ ±1,5x10 ⁶ ***	0,3x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶ ***	3,0x10 ⁶ ±1,4x10 ⁶ ***
FoxP3+ Zellen[§]	1,4x10 ⁶ ±0,3x10 ⁶	0,7x10 ⁶ ±0,3x10 ⁶ ***	0,2x10 ⁶ ±0,1x10 ⁶ ***	0,1x10 ⁶ ±0,1x10 ⁶ ***	0,02x10 ⁶ ±0,01x10 ⁶ ***	0,4x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶ ***
%FoxP3 Zellen[#]	11,1±2,9	10,53±1,3	8,7±1,0	6,7±2,7 **	6,6±1,9 *	12,0±0,1 *

§ als Subpopulation der CD4⁺ CD25^{high} Zellen, # als Prozent der CD4⁺ T-Zellen, ± Standardabweichung,

Signifikanzniveau (Bonferroni's Multiple Comparison Test):

* $p < 0,05$ im Vergleich zu Tag 0; ** $p < 0,01$ im Vergleich zu Tag 0

*** $p < 0,001$ im Vergleich zu Tag 0

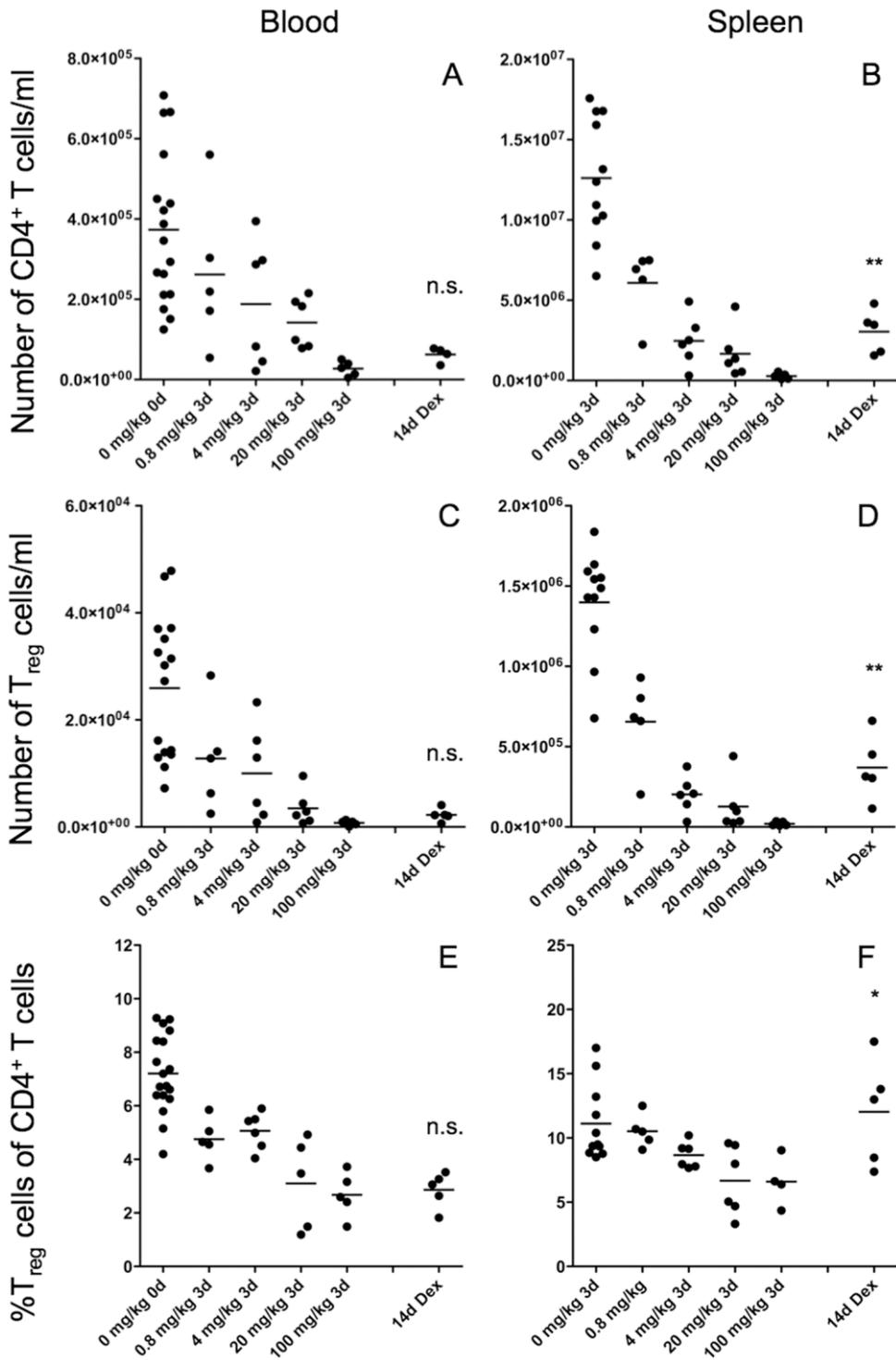


Abbildung 19: Grafische Darstellung Glukokortikoidstudie im Mausmodell. A, C und E: zirkulierende Immunzellen bei verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen und nach 14-tägiger oraler Dosisreduktion; B, D und F Untersuchung der Immunzellen der Milz bei verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen und nach 14-tägiger oraler Dosisreduktion (A und B: CD4⁺ Zellen, C und D: FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen, E und F: Anteil regulatorischer T-Zellen an den CD4⁺ Zellen), Signifikanzniveau: * p < 0,05 %, **p < 0,01 % n.s. = nicht signifikant (aus Sbiera S, Dexneit T, Reichardt SD, Michel KD, van den Brandt J, et al. (2011) Influence of Short-Term Glucocorticoid Therapy on Regulatory T Cells *In Vivo*. PLoS ONE 6(9): e24345. doi:10.1371/journal.pone.0024345)

4.6.2 Einfluss von Glukokortikoiden auf die peripheren Immunzellen vermeintlich immunologisch gesunder Patienten mit Hörsturz

4.6.2.1 Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen

Das mittlere Alter der 16 untersuchten Patienten betrug $35,8 \pm 13$ Jahre. Wie erwartet kam es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamt-Leukozyten im peripheren Blut nach der 14-tägigen Glukokortikoidtherapie nach dem Stennert-Schema (s. Tabelle 16). Dieser Anstieg ist vor allem durch eine Verdoppelung neutrophiler Granulozyten und monozytärer Zellen bedingt. Die Anzahl eosinophiler und basophiler Granulozyten veränderte sich nicht. Des Weiteren kam es zu einem signifikanten 50-prozentigen Anstieg der Lymphozyten von 2×10^6 auf 3×10^6 Zellen/ μ l. Es zeigt sich auch bei den wie in 3.2.6 errechneten Absolutzahlen der $CD3^+$ T-Zellen ein hochsignifikanter Anstieg im Mittel von $1,5 \times 10^6$ auf $2,3 \times 10^6$ Zellen pro Mikroliter ($p < 0,001$). Betrachtet man die Subpopulationen der $CD8^+$ und $CD4^+$ Zellen, zeigt sich nach der 2-wöchigen Glukokortikoidtherapie ebenfalls ein signifikanter mittlerer Anstieg von $11,0 \times 10^5$ auf $18,0 \times 10^5$ für $CD4^+$ und von $4,0 \times 10^5$ auf $5,8 \times 10^5$ für $CD8^+$ Zellen. Die genauen Zahlen und die dazugehörigen p-Werte sind in Tabelle 17 ersichtlich. Mit Ausnahme des Merkmals AITR zeigten sich bei den jeweiligen Charakterisierungsmerkmalen regulatorischer T-Zellen signifikante Anstiege der Absolutzahlen. Bei den $FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen kam es zu einem leichten absoluten Anstieg von im Mittel 62×10^3 auf 82×10^3 Zellen. Ein nicht signifikanter absoluter Anstieg von $8,9 \times 10^3$ auf $10,0 \times 10^3$ zeigte sich bei den AITR positiven regulatorischen T-Zellen. $CD4^+CD25^{high}$ Zellen verdoppelten sich in der absoluten Anzahl im Mittel nahezu von 56×10^4 auf 100×10^4 Zellen. Von Beginn an nahmen mit $1,6 \times 10^5$ diejenigen Zellen den größten Anteil ein, die CTLA-4 positiv waren. Sie stiegen im Durchschnitt auf $3,0 \times 10^5$ Zellen pro Mikroliter. Die Auswertung der FACS-Analysen vor und nach Glukokortikoidtherapie ist in Abbildung 20 dargestellt.

Tabelle 16: Absolutzahlen der Leukozyten im peripheren Blut vor und nach 2 Wochen Glukokortikoidtherapie

Zellen	Absolute Zellzahl pro μl vor Therapie	Absolute Zellzahl pro μl nach 14 Tagen Steroidtherapie	p-Wert
Leukozyten	$7,3 \pm 3,0 \times 10^6$	$13,0 \pm 4,2 \times 10^6$	$p < 0,001$
Neutrophile	$4,6 \pm 2,6 \times 10^6$	$9,3 \pm 3,7 \times 10^6$	$p < 0,001$
Basophile	$1,7 \pm 4,0 \times 10^4$	$7,0 \pm 3,0 \times 10^3$	n.s.
Eosinophile	$1,4 \pm 1,4 \times 10^5$	$5,8 \pm 1,0 \times 10^5$	n.s.
Monozyten	$5,0 \pm 1,5 \times 10^6$	$8,5 \pm 2,6 \times 10^6$	$p < 0,001$
Lymphozyten	$2,0 \pm 0,7 \times 10^6$	$3,0 \pm 1,3 \times 10^6$	$p < 0,01$
CD3⁺ Zellen	$1,5 \pm 0,6 \times 10^6$	$2,3 \pm 1,0 \times 10^6$	$p < 0,001$
CD4⁺ Zellen	$11,0 \pm 4,0 \times 10^5$	$18,0 \pm 7,7 \times 10^5$	$p < 0,001$
CD8⁺ Zellen	$4,0 \pm 2,5 \times 10^5$	$5,8 \pm 3,1 \times 10^5$	$p < 0,001$
FoxP3⁺ Zellen	$6,2 \pm 3,5 \times 10^4$	$8,2 \pm 4,7 \times 10^4$	$p < 0,05$
AITR⁺ Zellen	$8,9 \pm 6,8 \times 10^3$	$10,0 \pm 9,0 \times 10^3$	n.s.
CD127^{low} Zellen	$5,6 \pm 2,4 \times 10^4$	$10,0 \pm 6,0 \times 10^4$	$p < 0,001$
CTLA-4⁺ Zellen	$1,6 \pm 0,7 \times 10^5$	$3,0 \pm 2,0 \times 10^5$	$p < 0,05$

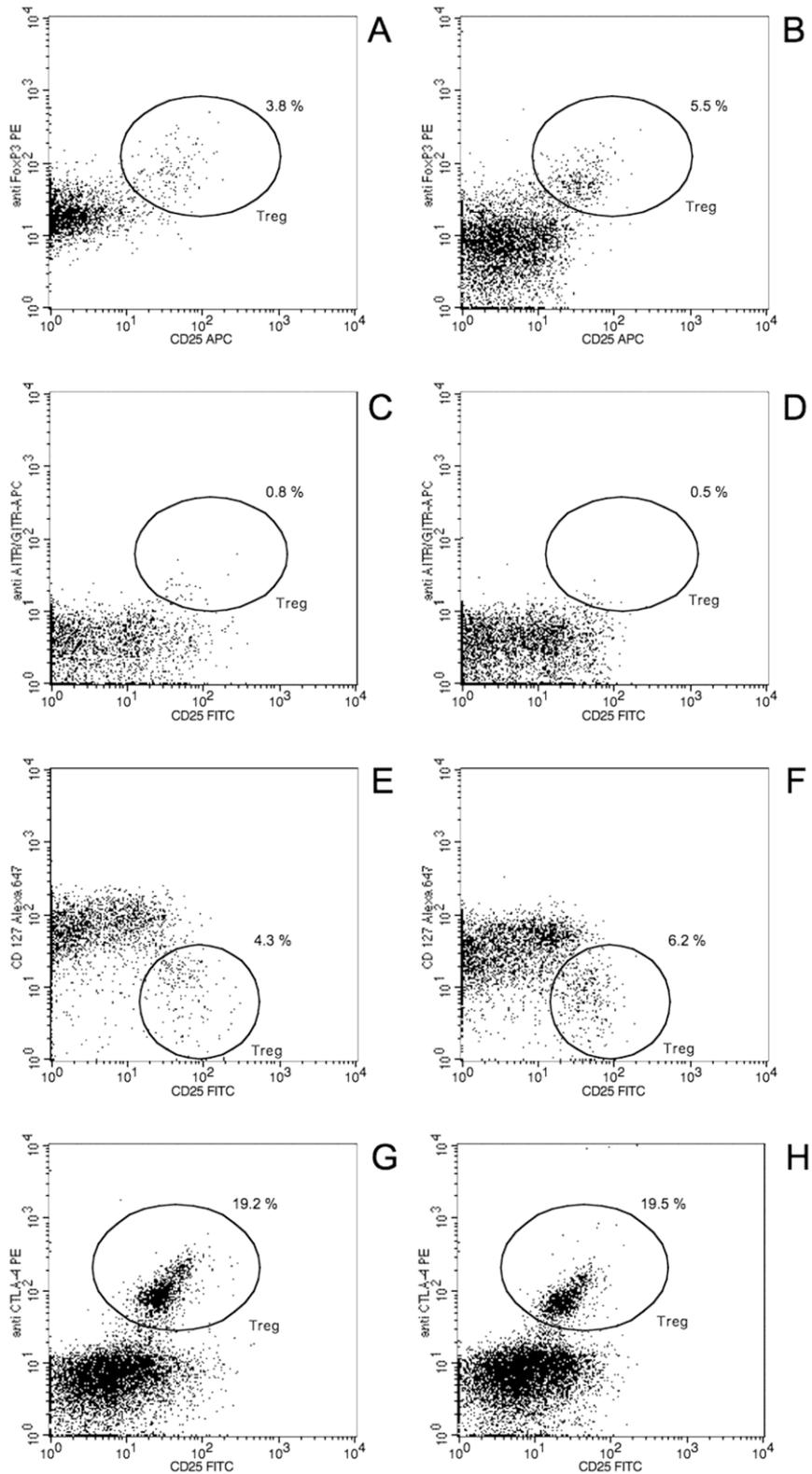


Abbildung 20: Regulatorische T-Zellen nach 3 Tagen (A,C,E,G) und nach 14 Tagen (B, D, F, H) Glukokortikoidstoßtherapie bei Hörsturzpatienten (aus Sbiera S, Dexneit T, Reichardt SD, Michel KD, van den Brandt J, et al. (2011) Influence of Short-Term Glucocorticoid Therapy on Regulatory T Cells *In Vivo*. PLoS ONE 6(9): e24345. doi:10.1371/journal.pone.0024345)

4.6.2.2 *Vergleich der relativen Leukozytensubpopulationen*

Wie in Tabelle 17 dargestellt, zeigen sich in der relativen Verteilung der Subpopulationen der Leukozyten, mit Ausnahme der Eosinophilen, keine signifikanten Veränderungen. Bei den eosinophilen Granulozyten kam es zu einem signifikanten Abfall im Mittel von 2,5 auf 0,9 Prozent ($p < 0,05$). Es kam zu einem leichten, nicht signifikanten, relativen Anstieg der neutrophilen Granulozyten von 60,4 auf 68,0 Prozent und zu einem leichten, nicht signifikanten, relativen Abfall der monozytären Zellen von 7,5 auf 6,5 Prozent. Die Häufigkeit der Lymphozyten gemessen an den PBMC blieb gleich ($58,0 \pm 11,0$ Prozent vor und $58,0 \pm 9,0$ Prozent nach Therapie). Die Verteilung der CD4 und CD8 positiven Zellen blieb mit $75,5 \pm 9,0$ vs. $24,5 \pm 9,0$ Prozent vor und $75,7 \pm 7,5$ vs. $24,3 \pm 7,5$ Prozent nach Therapie ebenfalls nahezu gleich. Betrachtet man nun die Verteilung der regulatorischen T-Zellen in den verschiedenen Charakterisierungsmerkmalen, so zeigte sich ein gerade signifikanter relativer Abfall der $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen als Teil der $CD4^+$ Zellen von im Mittel 4,0 auf 3,4 Prozent ($p < 0,05$). Die Frequenz der AITR positiven regulatorischen T-Zellen veränderte sich vor und nach der Therapie nicht (0,6 Prozent vor und 0,5 Prozent nach Therapie). Ein signifikanter prozentualer Anstieg war bei den $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ Zellen von 4,0 auf 5,0 Prozent zu verzeichnen ($p < 0,05$). Ein weiterer jedoch nicht signifikanter Anstieg zeigte sich bei den $CD4^+CD25^{high}CTLA-4^+$ Zellen von 13,8 auf 15,6 Prozent.

Tabelle 17: Prozentzahlen der Zellen im peripheren Blut vor nach 2 Wochen Glukokortikoidtherapie gemessen an den Leukozyten

Zellen	Relative Zellzahl vor Therapie(%)	Relative Zellzahl nach 14 Tagen Steroidtherapie(%)	p-Wert
Neutrophile*	60,4 ± 11,6	68,0 ± 10,3	n.s.
Basophile*	0,2 ± 0,5	0,1 ± 0,3	n.s.
Eosinophile*	2,5 ± 2,6	0,9 ± 0,7	p<0,05
Monozyten*	7,5 ± 2,3	6,5 ± 1,7	n.s.
Lymphozyten*	28,7 ± 8,5	24,0 ± 9,6	n.s.
CD3 ⁺ Zellen [#]	58,0 ± 11,0	58,0 ± 9,0	n.s.
CD4 ⁺ Zellen [§]	75,5 ± 9,0	75,7 ± 7,5	n.s.
CD8 ⁺ Zellen [§]	24,5 ± 9,0	24,3 ± 7,5	n.s.
FoxP3 ⁺ Zellen [§]	4,0 ± 1,5	3,4 ± 1,5	p<0,05
AITR ⁺ Zellen [§]	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,3	n.s.
CD127 ^{low} Zellen [§]	4,0 ± 1,3	5,0 ± 3,0	p<0,05
CTLA-4 ⁺ Zellen [§]	13,8 ± 11,5	15,6 ± 12,5	n.s.

* als Prozent der Leukozyten, # als Prozent der PBMC, § als Prozent der CD3⁺ T-Zellen, § als Prozent der CD4⁺ T-Zellen, ± Standardabweichung, n.s. nicht signifikant

4.6.2.3 Untersuchung der Nebennierenfunktion nach 14 Tagen Steroidtherapie

Bei 10 Patienten wurde nach der 14-tägigen Prednisolongabe ein ACTH-Test durchgeführt. Bei den anderen 6 Patienten war die Durchführung aus logistischen Gründen nicht möglich. Der hierbei bestimmte 60-Minuten-Wert des Serum-Kortisols muss einen Wert von 20 µg/dl überschreiten, damit die Funktion der Nebenniere laborchemisch als normal gilt. Bleibt der Wert unterhalb der Grenze von 20 µg/dl, so ist die Nebenniere (partiell oder komplett) supprimiert.

Bei 8 der 10 Patienten blieb der 60-Minuten-Serum-Kortisol-Wert unter der Grenze von 20 µg/dl (s. Tabelle 18, Abbildung 21). Die Nebennieren dieser Patienten waren durch die Glukokortikoidtherapie also laborchemisch supprimiert. Im Mittel stieg das Serum-Kortisol von 5,3 ± 4,1 auf 13,4 ± 6,7 µg/dl 60 Minuten nach ACTH-Injektion. Demnach muss bereits nach einer 14-tägigen

Hochdosistherapie mit Prednisolon wie in unserem Fall mit Nebennierensuppression gerechnet werden.

Tabelle 18: Werte des ACTH-Stimulationstests

	Kortisol 0 min in µg/dl	Kortisol 60 min in µg/dl
Patient A	1,99	14,6
Patient B	4,55	10,1
Patient C	9,96	20,2
Patient D	11,4	28,7
Patient E	1,0	9,48
Patient F	6,27	14,0
Patient M	4,88	11,6
Patient N	1,0	6,97
Patient O	10,7	11,7
Patient P	1,24	6,69

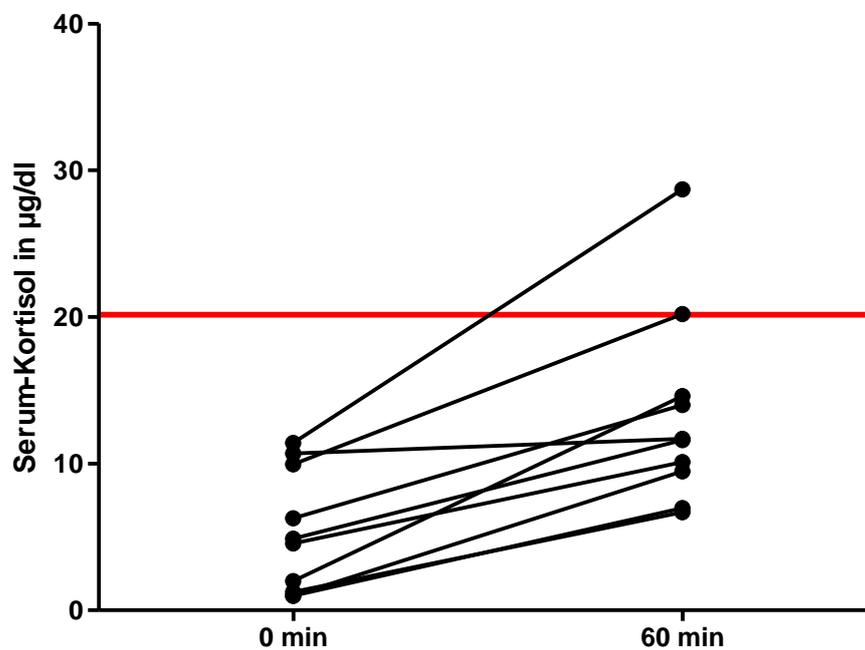


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Ergebnisse des ACTH-Stimulationstests

5 Diskussion

5.1 Nebennierenkarzinompatienten mit einer hohen Anzahl zirkulierender Treg haben ein kürzeres Gesamtüberleben, der Kortisolexzess hat jedoch keinen Einfluss auf die Frequenz der Treg

In vielen klinischen Studien wurde gezeigt, dass Tumorpatienten eine erhöhte Anzahl zirkulierender regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe aufweisen. So zeigten die Arbeitsgruppen von Woo et al. und Liyanage et al. erhöhte Anzahlen zirkulierender regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Pankreaskarzinomen sowie Adenokarzinomen der Mamma [100; 101]. Deshalb wurde in dieser Arbeit das periphere Blut von Nebennierenkarzinompatienten auf regulatorische T-Zellen untersucht. Hier war ein hochsignifikanter Unterschied bei den zirkulierenden regulatorischen T-Zellen von Nebennierenkarzinompatienten zu denen gesunder Probanden zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass es analog zu anderen Tumoren beim Nebennierenkarzinom Mechanismen, wie zum Beispiel die tumorbedingte Synthese von Interleukinen wie TGF- β oder aber auch die Präsentation von Tumorantigenen durch antigenpräsentierende Zellen gibt, die für die Erhöhung des Anteils der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen verantwortlich sind [1]. Interessant und überraschend war, dass es ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl zirkulierender Treg der Kontrollgruppe und den zirkulierenden Treg der Nebennierenkarzinompatienten, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme kein Tumor nachweisbar war, zu verzeichnen war. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die Tatsache sein, dass die klinischen und bildgebenden Untersuchungen nicht sensitiv genug waren, die als tumorfrei deklarierten Patienten zu dem Zeitpunkt ein nicht erkennbares Tumorrezidiv hatten. Eine andere Möglichkeit ist eine Veränderung des Immunsystems durch den Tumor, die zeitlich über die Resektion des Tumors hinaus reicht. Es lässt die Hypothese zu, dass der Zeitraum zwischen der immunologischen Veränderung des Immunsystems durch den Tumor und der erneuten Untersuchung des Bluts nicht ausgereicht hat, und somit die Veränderungen noch bestanden.

Da durch klinische Studien gezeigt wurde, dass die Zahl und die Verteilung regulatorischer T-Zellen durch Anwesenheit von Glukokortikoiden gesteigert werden und es somit zu einer Glukokortikoid-bedingten erhöhten Anzahl zirkulierender Treg im Blut von Nebennierenkarzinompatienten mit endogenem Glukokortikoidexzess kommen kann, wurden in dieser Arbeit die zirkulierenden Treg von Nebennierenkarzinomen mit und ohne endogenem Steroidexzess verglichen [152; 153; 154]. Hier zeigte sich entgegen der Erwartungen aus der Literatur, jedoch in Einklang mit den Ergebnissen aus der Untersuchung immunologisch gesunder Patienten und des Maus-Modells (siehe Kapitel 4.6), kein signifikanter Unterschied zwischen den zirkulierenden Treg von Patienten mit oder ohne endogenen Steroidexzess.

Aus den gewonnenen Daten wurde eine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und dem Steroidexzess sowie dem Gesamtüberleben und der Anzahl regulatorischer T-Zellen durchgeführt. Es fiel auf, dass sich das Überleben der Tumorpatienten mit und ohne Glukokortikoidexzess deutlich unterschied. Tumorpatienten mit Cushing-Syndrom hatten ein deutlich kürzeres Überleben als Tumorpatienten ohne Cushing-Syndrom. Die Hazard Ratio zeigte ein erhöhtes Risiko an einem Tumor, welcher einen Glukokortikoidexzess verursacht, zu versterben. Hier lässt sich die Kausalität nur mutmaßen. Es ist sicher möglich, dass es durch die Immunsuppression durch den Tumor selbst in Kombination der Glukokortikoid-vermittelten Immunsuppression zu einer erhöhten Anzahl von supportiven Infektionen kommt. Auch denkbar sind Unfallgeschehen, die durch den Glukokortikoidexzess bedingt sind.

Zu erwarten war, dass Patienten, die sich aktuell in Remission befanden, ein deutlich längeres Überleben als Patienten die einem nachweisbaren Tumor hatten.

In der Korrelation der Anzahl regulatorischer T-Zellen mit dem Überleben zeigte sich in der univariaten Analyse ein schlechteres Überleben der Nebennierenkarzinompatienten mit einer höheren Anzahl zirkulierender regulatorischer T-Zellen. Dieses Ergebnis konnte die Arbeitsgruppe von Liu et al. bei Patienten mit Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen ebenfalls zeigen [188]. In

der multivariaten Untersuchung, bezogen auf Tumormasse und den endogenen Glukokortikoidexzess, ließ sich jedoch dieses Ergebnis nicht nachweisen.

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass eine antihormonelle Therapie des Nebennierenkarzinoms aufgrund des deutlich schlechteren Überlebens sinnvoll ist, da es die hormonellen Wirkungen senkt und die Lebensqualität steigert. Eine antihormonelle Therapie mit dem Ziel eine Veränderung in der Subpopulation der regulatorischen T-Zellen zu erreichen, erscheint aus den Daten dieser Arbeit nicht sinnvoll.

5.2 Die häufigsten Nebennierenkarzinom-infiltrierenden Immunzellen sind zytotoxische T-Zellen

Bisher wurde bei vielen Tumorentitäten eine Tumordinfiltration durch das Immunsystem beschrieben. Literatur über Tumor-infiltrierende Zellen bei Nebennierenadenomen oder -karzinomen ist selten. Es handelt sich meist in der Literatur um Fallberichte, welche allgemein infiltrierende Lymphozyten beschreiben, ohne diese phänotypisch weiter zu charakterisieren [189; 190].

In der aktuellen Arbeit wurden die immunhistochemischen Schnitte durch mehrere Untersucher begutachtet und es zeigten sich keine Unterschiede der Ergebnisse, was die Aussage der Arbeit daher untermauert.

Ziel dieser Arbeit war es, Nebennierentumore auf die Infiltration durch das Immunsystem zu untersuchen. Sie zeigt, dass Nebennierentumore - insbesondere Nebennierenkarzinome - analog zu anderen Tumorarten, wie dem kolorektalen Karzinom, Glioblastom und dem Ovarialkarzinom, durch Zellen des erworbenen Immunsystems infiltriert werden [11; 12; 42]. Es wurde gezeigt, dass bei knapp drei Viertel der untersuchten primären Nebennierenkarzinome ein Immuninfiltrat vorhanden war. Eine vergleichbare Anzahl von vorhandenen Immuninfiltraten zeigte die Arbeitsgruppe von Erdag et al., welche die Immuninfiltration von Metastasen eines Malignen Melanoms untersuchten (71 Prozent der untersuchten Gewebe enthielten ein Immuninfiltrat) [126]. Insgesamt zeigten 77,8 Prozent der untersuchten Primärtumore ein Tumordinfiltrat durch T-Zellen. Im Vergleich der Mittelwerte der

pro High Power Field vorhandenen T-Zellen der Metastasen, der Primär- und Rezidivtumore fällt auf, dass der Mittelwert der Rezidivtumore nahezu doppelt so groß ist als der der Primärtumore (50 vs. 29). Allerdings ist die Anzahl der untersuchten Rezidivtumore und Metastasen erheblich geringer und zeigt eine größere Varianz.

Vergleicht man die Tumor-infiltrierenden T-Helfer-Zellen mit den zytotoxischen T-Zellen (CTL) in Primärtumoren, zeigt sich, dass Nebennierentumoren häufiger durch zytotoxische T-Zellen infiltriert werden. In den untersuchten Primär- und Rezidivtumoren sind mit einem leichten Übergewicht der zytotoxischen T-Zellen gegenüber den T-Helfer-Zellen die Mittelwerte der pro HPF gefundenen Subgruppen der T-Zellen nahezu gleich (17 vs. 11 und 27 vs. 22). Im untersuchten Metastasengewebe zeigt sich nahezu ein gleiches Bild: Die Anzahl der pro HPF gezählten T-Helfer und zytotoxische T-Zellen ist auch hier nahezu gleich (8 vs. 10). Die erhöhte Anzahl sowohl der zytotoxischen T-Lymphozyten als auch der T-Helfer-Zellen in den Rezidivtumoren verglichen mit den Primärtumoren ist durch die größere Varianz und der kleineren Fallzahl zu erklären. Die Beschaffenheit des Immuninfiltrates ändert sich also bei einem Rezidivtumor des Nebennierenkarzinoms nicht, ähnlich zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Kim et al. bei Patienten mit Glioblastomen [42]. Vergleicht man die Anzahl der infiltrierenden CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen (17,8 Zellen/HPF, Standardfehler 5,8) mit anderen Tumorentitäten, zeigten sich bei kolorektalen Karzinomen mit 92 Zellen/HPF [191] eine größere Anzahl zytotoxischer T-Zellen, bei malignen Melanomen hingegen mit 10,4 zytotoxischen T-Zellen/HPF (Standardfehler 3,5) eine geringere Anzahl [126]. Im Vergleich der Nebennierenkarzinom-infiltrierenden CD4 positiven T-Helferzellen zu anderen Tumorentitäten zeigten sich im Mittel 11,0 (SE 2) deutlich weniger T-Helferzellen/HPF als beim klarzelligen Nierenzellkarzinom (26,6 CD4⁺ Zellen/HPF, Standardfehler 26,9) [192], jedoch im Vergleich zum malignen Melanom mit 6,5 CD4⁺ Zellen/HPF (Standardfehler 1,9) deutlich mehr [126].

Aufgrund der Studien von Aruga et al., Lowes et al. und Fallarino et al. liegt hier die Vermutung nahe, dass auch beim Nebennierenkarzinom die infiltrierenden Immunzellen eine Antwort gegen Tumorantigene generieren [27]. Bezüglich des

Übergewichts zugunsten der zytotoxischen T-Zellen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass aufgrund des Fehlens von MHC II Molekülen [34] eine MHC I-basierte Immunantwort gebildet wird und diese nur durch T-Helfer-Zellen unterstützt wird [70; 71; 72]. Ebenso fand die Arbeitsgruppe von Yamamoto et al. ein Immuninfiltrat in Nebennierenkarzinomen und zeigte ex vivo in 2 von 3 Fällen eine zytotoxische T-Zell-Antwort in Form von einer Lyse gegen autologe Tumorzellen von Nebennierenkarzinomen. Die Arbeitsgruppe beschrieb jedoch das Immuninfiltrat nicht näher [193].

Tumorinfiltrierende regulatorische T-Zellen werden in der vorhandenen Literatur bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben [15; 106; 107; 108; 109]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen Nebennierenkarzinome, deren Rezidive und metastatischen Absiedlungen infiltrieren. Die absolute Anzahl der pro HPF im Tumorstroma gefundenen regulatorischen T-Zellen war jedoch nicht hoch: im Mittel waren 1,9 (Standardfehler 0,5) Treg/HPF (Median 0, Range 0-18) zu detektieren. Bei anderen Tumorentitäten zeigten sich ähnliche Werte: Bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurden im Median 8 (Range 1-40) Treg/HPF detektiert [194], bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen im Mittel 2,2 Treg/HPF (Standardfehler 4) [192] und bei malignen Melanomen im Mittel 1,8 Treg/HPF (Standardfehler 0,4) [126]. Würden Glukokortikoide, wie in der Arbeitshypothese vermutet, zu einem Selektionsvorteil für regulatorische T-Zellen führen, würde man vermehrt regulatorische T-Zellen in hormonell aktiven Nebennierenkarzinomen erwarten. Da das aber in dieser Arbeit nicht der Fall war, ist dies zusätzlich mit den Ergebnissen der Glukokortikoidstudie mit Hörsturzpatienten konform: Bei Anwesenheit eines Glukokortikoidproduzierenden Tumors kommt es nicht zu einer deutlich erhöhten Absolutzahl regulatorischer T-Zellen im Tumorstroma.

Gegen die Selektion regulatorischer T-Zellen bei Anwesenheit von Glukokortikoiden spricht, dass bei der Untersuchung von peripher gewonnenen zirkulierenden Treg kein signifikanter Unterschied zwischen Tumorpatienten mit und ohne Cushing-Syndrom vorhanden war.

Bezüglich der B-Zellen findet sich wenig Literatur zur Infiltration von soliden Tumoren durch B-Zellen. In der Arbeit von Erdag et al. konnten CD20 positive

B-Zellen mit einer mittleren Anzahl von 9,2 Zellen/HPF (Standardfehler 3,5) beschrieben werden[126]. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen das B-Zell-Protein CD19 verwendet und es zeigten sich in allen untersuchten Tumorproben keine B-Zellen. Ein Fehlen eines B-Zell-Infiltrats bedeutet jedoch nicht, dass bei Patienten mit Nebennierenkarzinomen keine B-Zell-Immunantwort generiert wird. Es ist möglich, dass B-Zellen bzw. Plasmazellen Antikörper gegen Tumorantigene bilden. Durch die Untersuchungen dieser Arbeit kann jedoch nicht festgestellt werden, ob beim Nebennierenkarzinom eine B-Zell-Immunantwort generiert wird, oder nicht. Dies sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Die Tumordinfiltration von dendritischen Zellen wurde in anderen Karzinomentitäten untersucht, bei Nebennierenkarzinomen existieren keine Vergleichsdaten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Nebennierenkarzinome, sowie deren Rezidive und Metastasen durch eine im Vergleich nahezu identische Anzahl dendritischer Zellen infiltriert werden. Nebennierenkarzinome haben mit 4,2 CD209 positiven dendritischen Zellen/HPF eine deutlich geringere mittlere Anzahl Tumor-infiltrierender dendritischer Zellen als bei Kolonkarzinomen, bei denen 15,4 S100 positive dendritische Zellen/HPF detektiert wurden [195]. Beim malignen Melanom zeigten sich deutlich weniger dendritische Zellen/HPF (0,07 SE 0,03, DC-LAMP) [126].

5.3 Das Immuninfiltrat beeinflusst das Gesamtüberleben von Nebennierenkarzinompatienten nicht

Das Gesamtüberleben von Patienten wird durch eine Immuninfiltration solider Tumoren beeinflusst [11; 12; 13; 14]. So zeigte sich bei Melanomen und Ovarialkarzinomen bei Tumordinfiltraten durch CD3 positive T-Zellen und bei Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen bei einem Tumordinfiltrat durch CD8 positive T-Zellen jeweils ein signifikant längeres Überleben [11; 12; 13; 32; 40; 41]. Die Rolle eines Immuninfiltrats durch T-Helfer-Zellen bezüglich des Gesamtüberlebens wird in der Literatur kontrovers diskutiert [27; 39; 70; 71; 72; 73; 74; 76; 80; 83].

In der Arbeit wurde daher eine Korrelation zwischen einem Immuninfiltrat von Nebennierenkarzinomen und dem Überleben durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten zeigt sich bei Patienten mit Nebennierenkarzinomen kein signifikanter Überlebensvorteil durch eine Tumordinfiltration von CD3 positiven T-Zellen, CD4 positiven T-Helfer-Zellen oder CD8 positiven zytotoxische T-Zellen. Bei den T-Helfer-Zellen zeigte sich ein leichter Trend zum besseren Überleben, je größer die Anzahl tumorinfiltrierender CD4 positiver T-Helferzellen war. Es ist möglich, dass es sich hierbei um einen echten Überlebensvorteil handelt, der allerdings aufgrund der geringen Fallzahl und der Heterogenität des Überlebens der Patienten maskiert wurde und daher kein signifikantes Ergebnis entstand.

Tumordinfiltrierende regulatorische T-Zellen werden in vorhandener Literatur gegensätzlich diskutiert. Bei einigen Tumorentitäten führt es zu einem kürzeren Gesamtüberleben [15; 106], bei anderen Tumorentitäten hingegen zu einem längeren Überleben [107; 108; 109]. Insgesamt zeigte sich in dieser Arbeit bezüglich des Gesamtüberlebens kein signifikantes Ergebnis und dies gilt insbesondere für Tumor-assoziierte regulatorische T-Zellen.

In der Literatur wurde bisher auch kontrovers diskutiert, ob sich ein Immuninfiltrat von dendritischen Zellen positiv oder negativ auf das Gesamtüberleben auswirkt [119; 120; 121; 122; 123; 127]. Im Falle des Nebennierenkarzinoms zeigte sich in dieser Arbeit ein nicht signifikanter Trend zum kürzeren Gesamtüberleben, je größer die Anzahl infiltrierender CD209 positiver dendritischer Zellen war. Wenn man die Gruppe beim Median schneidet und die Hazard Rate berechnet, zeigte sich bei den Patienten ein signifikant höheres Risiko zu sterben, die ein größeres Immuninfiltrat aufwiesen. Insgesamt muss bei diesen Ergebnissen jedoch unbedingt beachtet werden, dass hier nur eine sehr kleine Fallzahl untersucht wurde. Einen Schluss zu ziehen, dass eine Tumordinfiltration durch dendritische Zellen zu einem schlechteren Gesamtüberleben führt, erscheint daher nicht sinnvoll. Falls sich der Trend in den künftigen Ergebnissen bestätigt, sollte der Mechanismus im Bezug auf die dendritischen Zellen, der dazu führt, dass Patienten durch eine größere Tumordinfiltration durch CD209 positive dendritische Zellen früher

versterben, näher beleuchtet werden. Hypothetisch ist eine Veränderung des Tumormilieus in Erwägung zu ziehen, was zu einer Tumorprogression durch Suppression der T-Zell-Antwort kommt [119; 120; 196]. Ähnliche Ergebnisse erhielt die Arbeitsgruppe von Sisirak et al. bei denen aggressivere Mammakarzinome mit einer Tumordinfiltration mit dendritischen Zellen assoziiert waren [123].

In der bestehenden Literatur wird auch berichtet, dass es durch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren des Immuninfiltrats im Tumor selbst zu einer Angiogenese führen kann. Durch diese proinflammatorischen Mediatoren kann daher ein pro-metastatischer Effekt entstehen [197; 198; 199; 200; 201; 202]. Es ist daher auch möglich, dass dieser Effekt bei einem Tumordinfiltrat im Nebennierenkarzinom auch vorhanden ist. Daher kann hier nur spekuliert werden, ob pro- und antitumoröse Effekte eines Immuninfiltrates sich im Falle des Nebennierenkarzinoms gegenseitig aufheben und deshalb kein signifikant besseres oder schlechteres Ergebnis bezüglich eines Gesamtüberlebens sichtbar wurde.

5.4 Das Immuninfiltrat beeinflusst das Rezidiv-freie Überleben von Nebennierenkarzinompatienten nicht

Das Rezidiv-freie Überleben wurde in vielen Studien mit Tumor-infiltrierenden Leukozyten korreliert. In neuroendokrinen Tumoren des Pankreas zeigte sich bei einer höheren Immuninfiltration durch CD3 positive T-Zellen ein längeres Rezidiv-freies Intervall als bei einer geringeren Infiltration [33]. Auch bei Glioblastomen zeigte sich ein signifikant längeres Rezidiv-freies Überleben bei einer Tumordinfiltration von CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen [42]. In selbiger Studie konnte jedoch keine Verlängerung des Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat der Gliome durch CD4 positive Zellen beobachtet werden. Bei Prostata-Karzinomen hingegen zeigte sich ein signifikant kürzeres Rezidiv-freies Überleben bei einer erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen im Tumordinfiltrat [111]. Ein ähnliches Ergebnis,

allerdings im Bezug auf die Tumorprogression, zeigte sich bei Adenokarzinomen des Pankreas [110].

In dieser Arbeit kann jedoch kein Vor- oder Nachteil bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens aufgezeigt werden. Es zeigt sich bei keinen der untersuchten tumorinfiltrierenden Immunzellen ein signifikantes Ergebnis. Lediglich bei einer Tumorinfiltration durch CD8 positive T-Zellen zeigt sich ein leichter Trend zu einem längeren Rezidiv-freien Überleben, je größer das Immuninfiltrat war.

Analog zu dem Trend ein kürzeres Gesamtüberleben zu haben, je mehr dendritische Zellen im Nebennierenkarzinom vorhanden waren, zeigte sich passend ein Trend früher ein Rezidiv zu erleiden, je größer eine Tumorinfiltration durch CD209 positive dendritische Zellen war. Jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant. Auch muss hier die kleine Fallzahl bedacht und somit das Ergebnis vorsichtig interpretiert werden.

Möglicherweise kann es durch eine höhere Fallzahl hier zu einem signifikanten Ergebnis kommen. Somit wäre ein weiterer möglicher Prognosefaktor für das Nebennierenkarzinom identifiziert.

Anders als es in der Literatur bei Pankreaskarzinomen beschrieben wurde, zeigte sich bei Nebennierenkarzinompatienten kein signifikanter Unterschied beim Rezidiv-freien Überleben, wenn die Tumore durch regulatorische T-Zellen infiltriert wurden. Eine Tumorinfiltration durch regulatorische T-Zellen führt weder zu einer signifikanten Verlängerung, noch zu einer signifikanten Verkürzung des Rezidiv-freien Gesamtüberlebens.

5.5 Glukokortikoide führen im Menschen und im Mausmodell weder zu einem Anstieg der Subpopulation regulatorischer T-Zellen noch beeinflussen sie die deren Funktion

Ein Zusammenhang von Glukokortikoiden mit sogenannten Suppressor-T-Zellen ist seit langem bekannt [149; 150]. Es zeigten sich in in-vivo Experimenten Beeinflussungen der Treg-Subpopulation durch Glukokortikoide [151]. In klinischen Studien zeigten sich Anstiege regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut durch eine immunsuppressive Therapie mit Glukokortikoiden [151; 152; 153; 154]. Ein Ziel der Arbeit war es zu zeigen, wie die

Subpopulation der regulatorischen T-Zellen auf das Vorhandensein von Glukokortikoiden in vivo bei gesunden Probanden reagiert.

Ein iatrogen induzierter 14-tägiger Glukokortikoidexzess mit Prednisolon oberhalb der "Cushingschwelle" verursachte in Menschen eine starke Leukozytose. Diese war vor allem bedingt durch den bekannten Anstieg der Granulozyten und Monozyten. Es zeigte sich jedoch entgegen der Erwartung auch ein leichter Anstieg der Leukozyten, somit auch der T-Lymphozyten mitsamt deren Untergruppen der T-Helfer- und T-Killer-Zellen. In dieser Arbeit wird, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den klinischen Studien der Arbeitsgruppen von Navarro et al. [152], Braitch et al. [153] und Azab et al. [154], in einem humanen in-vivo-Versuch gezeigt, dass eine 2-wöchige Therapie mit Glukokortikoiden, welche zunächst parenteral und anschließend enteral in langsam reduzierter Dosis verabreicht wurde, keinen Anstieg der relativen Anzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut zur Folge hat. Im Gegenteil: Es zeigte sich ein signifikanter Abfall FoxP3 positiver regulatorischer T-Zellen. Diese Ergebnisse widersprechen der Arbeit von Tuckermann et. al, welcher eine Apoptose von T-Zellen durch Glukokortikoide beschrieb [147].

Die Absolutwerte der FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen stiegen signifikant an. Da jedoch der relative Anteil signifikant abfiel bedeutet das, dass der übrige Anteil der CD4 positiven Zellen deutlich zugenommen haben muss.

Die in der Detailcharakterisierung von regulatorischen T-Zellen einbezogenen und in der Literatur [90; 91; 92; 93; 94] beschriebenen anderen Oberflächenmoleküle zeigten in der relativen Verteilung bis auf CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T-Helfer-Zellen keine signifikanten Veränderungen. Bei den Absolutwerten der Zellpopulationen zeigte sich in den Färbungen CTLA-4, FoxP3 und CD127^{low} ein signifikanter Anstieg. Bei der Färbung AITR veränderte sich die absolute Zellzahl nicht signifikant.

Die kooperierende Arbeitsgruppe von Reichardt et al. erhielt in einem an das humane Glukokortikoidschema angepassten murinen Modell ebenfalls einen dosisabhängigen Abfall FoxP3 positiver regulatorischer T-Zellen im Blut [203]. Interessant war, dass der prozentuale Abfall der regulatorischen T-Zellen größer war, als der Abfall der CD4 positiven T-Zellen. Der methodische

Unterschied zu anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls den Einfluss von GC auf regulatorische T-Zellen untersuchten, bestand in einer Glukokortikoid-Monotherapie mit Dexamethason. Hier sollten andere Einflussfaktoren, wie zum Beispiel die Immunmodulatoren IL-2 oder Vitamin D3, oder Vakzinierung immunsupprimierter Tiere, ausgeschlossen werden [204; 205]. Dies ist mit den Ergebnissen von Wüst et al. konform, welcher in einem Mausmodell ein Abfallen der regulatorischen T-Zellen unter einer Glukokortikoidtherapie, ähnlich den Therapieschemata bei Multipler Sklerose, beschreibt [186]. Ein Absinken von regulatorischen T-Zellen durch Verabreichung von Glukokortikoiden im Mausmodell wurde ebenfalls von Stock et al. beschrieben [206].

In der Milz zeigte sich nach der oralen Anschluss therapie eine Erholung sowohl der CD4 positiven Zellen als auch der FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen auf Werte, welche dem Ausgangswert nahekamen. Im Blut hingegen zeigte sich dieses Phänomen nicht. Daher wurde eine Glukokortikoid-bedingte dosisabhängige Apoptose von CD4 positiven T-Helfer-Zellen inklusive der regulatorischen T-Zellen postuliert. Der Anstieg der Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Milz legt eine Produktion von Treg in den sekundär lymphatischen Organen durch eine Induktion von dendritischen Zellen durch eine niedrige Dosis von Glukokortikoiden nahe, da bei einer Ausschüttung regulatorischer T-Zellen durch den Thymus die Anzahl im Blut ansteigen muss [207].

In der reinen Betrachtung der Absolutzellzahl oder der Prozentwerte lässt sich jedoch keine Aussage über eine Funktionalität einer Zellpopulation treffen. Es ist möglich, dass eine in der Zahl eingeschränkte Population regulatorischer T-Zellen im Zusammenspiel mit Glukokortikoiden eine besonders immunsuppressive Funktion besitzt. Hier wurden in ergänzenden in vitro-Experimenten durch die Göttinger Arbeitsgruppe von Reichardt et al. Funktionstests bei regulatorischen T-Zellen durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass die Produktion von IL-2 durch regulatorische T-Zellen sich bei Anwesenheit von Glukokortikoiden nicht verändert. Auch die Inhibition der Proliferation von T-Zellen durch Anwesenheit regulatorischer T-Zellen veränderte sich unter Glukokortikoideinfluss in vitro nicht. Somit kann man davon ausgehen, dass die Funktion der regulatorischen T-Zellen durch

Glukokortikoide nicht beeinflusst wird [203]. Da es sich jedoch um ein in vitro-Experiment handelt und in vivo andere Bedingungen mit mehr Variablen vorherrschen, kann man nicht ausschließen, dass Glukokortikoide in vivo doch einen Effekt auf die Funktionalität regulatorischer T-Zellen haben.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist zu schlussfolgern, dass Glukokortikoide keinen Einfluss auf regulatorische T-Zellen nehmen. Jedoch zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse in der molekularen Charakterisierung regulatorische T-Zellen, sodass dies ein möglicher Grund für die Abweichung unserer Ergebnisse zu bereits bestehender Literatur ist. Die bisherigen Arbeitsgruppen definierten zum Großteil regulatorische T-Zellen als CD4⁺CD25^{high} Zellen [152; 154], was jedoch nach heutigem Standpunkt für alle aktivierten T-Helferzellen zutrifft und somit eine unzureichende Definition regulatorischer T-Zellen ist. Dies hat zur Folge, dass in die Auswertung der anderen Arbeitsgruppen Zellen eingeflossen sind, die aus heutiger Sicht keine immunsuppressive Funktion besitzen. Des Weiteren bezogen sich die Forschungsergebnisse der anderen Arbeitsgruppen auf T-Zellen immunologisch erkrankter Menschen. Azab et al. zum Beispiel arbeitete mit Patienten die an einem systemischen Lupus erythematoses erkrankt waren [151; 152; 153; 154; 208; 209; 210; 211]. Es ist durchaus denkbar, dass Zellen eines erkrankten Immunsystems anders auf äußere Einflüsse reagieren, als Zellen eines gesunden Immunsystems. Die in der Literatur beschriebenen erhöhten Treg/CD4⁺-Verhältnisse ließen sich in der Arbeit nicht nachweisen [153; 154; 212]. Hypothetisch lässt sich schlussfolgern, dass Glukokortikoide in Menschen mit einer Erkrankung des Immunsystems zu einer Verbesserung des Mikromilieus führen. Dies hat scheinbar zur Folge, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen steigt. Es scheint auch so zu sein, dass die regulatorischen T-Zellen aus den sekundär lymphatischen Organen infolge einer primären Störung des Thymus durch eine Glukokortikoidtherapie rekrutiert werden, was zu einer Herstellung eines normalen Levels von T-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen führt und mit den Daten der Arbeitsgruppe von Screpanti et al. konform ist [213].

5.6 Eine 14-tägige Glukokortikoidstoßtherapie führt zur laborchemischen Nebennierensuppression

Nach gängiger Lehrmeinung besteht durch eine Glukokortikoidtherapie von unter 40 mg Prednisolon über eine Länge von 5 Wochen keine Gefahr einer Nebennierensuppression [214]. Es besteht jedoch die Möglichkeit einer Nebennierenrindenunterfunktion durch eine 3- bis 4-tägige GC-Hochdosistherapie [215]. Bei der Untersuchung der Patienten, die einen Hörsturz erlitten, erfolgte eine 14-tägige Medikation mit Prednisolon oberhalb der "Cushingschwelle". Um die Nebennierenfunktion nach der Glukokortikoidstoßtherapie mit anschließender Dosisreduktion zu überprüfen, führten wir einen ACTH-Stimulationstest durch. Es zeigte sich bei 9 von 10 Patienten eine laborchemische Nebennierensuppression. Da allerdings keiner der Patienten über Symptome einer Nebenniereninsuffizienz klagte, ist die klinische Bedeutung dieser Beobachtung unklar. In jedem Fall erscheint es sinnvoll die Patienten über die potenziellen Gefahren in besonderen Stresssituationen aufzuklären.

5.7 Diskussion limitierender Faktoren

Eine wesentliche Schwäche der vorliegenden Arbeit ist zweifelsohne die im Vergleich zu anderen Tumorentitäten relativ geringe Fallzahl von untersuchten Patienten. Wenn man sich allerdings die Seltenheit der Erkrankung (1-2 Fälle pro einer Million Einwohner pro Jahr) vor Augen führt, ist die Zahl der 231 Blut- und 58 Tumorproben als durchaus groß anzusehen, und dies sogar als Stärke der Arbeit zu bezeichnen. Zudem ist die Arbeit die Erste, die systematisch die Rolle von Immunzellen bei dieser Erkrankung untersucht hat.

Da die Datenerfassung retrospektiv erfolgte, beinhaltet die Arbeit den Einfluss unbekannter Fehlerquellen. Da aber keine spezielle Auswahl der Patienten erfolgte, sondern primär alle verfügbaren Proben verwendet wurden, wird auch hier das Risiko eines relevanten Bias für gering angesehen.

Das Erfassen von Zellen in Tumorschnitten oder FACS-Analysen ist stark untersucherabhängig und damit subjektiv. Daher wurden alle Zellzahl-

Erfassungen von mindestens zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt und deren Werte gemittelt, um eine größere statistische Aussagekraft zu erhalten.

Ein weiteres grundlegendes Problem ergab sich bei der Wahl der Färbungskombination bei der immunhistochemischen Färbung: CD3 und FoxP3. Die Kombination wurde gewählt, weil der vorhandenen Antikörper gegen CD4, CD8 und FoxP3 allesamt Maus-Antikörper waren, der CD3 Antikörper hingegen ein Hase-Antikörper war. Kombiniert man hier CD4 mit FoxP3, also 2 Maus-Antikörper, kann man nach Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper die Zellen nicht mehr differenzieren. Mit der Kombination CD3/FoxP3 färbt man regulatorische T-Zellen, da diese positiv für beide Marker sind, jedoch färbt man gleichzeitig auch andere aktivierte Effektor-T-Zellen, bei denen im aktiven Zustand FoxP3 induziert ist[99]. Diese Problematik könnte dafür verantwortlich sein, dass mögliche Effekte eines Treg-Infiltrats kaschiert wurden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass diese methodische Schwäche zu einer relevanten Veränderung der Ergebnisse geführt hat.

Eine weitere Limitation der Überlebenszahlen ist, dass das Patientenkollektiv vom Tumorstadium, insbesondere dem lokalen Stadium (Infiltration von V. cava oder Infiltration benachbarter Organe) und dem lymphogenen und hämatogenen Metastasierungsstadium, sehr heterogen war. Aufgrund dessen war die Prognose einiger Patienten limitiert. Es wurden daher univariate und multivariate Analysen durchgeführt, um mehrere Einflussfaktoren in die Aussage einfließen zu lassen.

Entgegen mehrerer Studien der Literatur zeigte sich bei der Arbeit kein Anstieg regulatorischer T-Zellen durch Glukokortikoide. Es wurde jedoch bei unterschieden Glukokortikoiden (endogenes Kortisol, Prednisolon, Dexamethason), bei unterschiedlichen Applikationsformen und in unterschiedlichen Modellen (Tumorpatient, immunologisch gesunder Patient und Tiermodell) gleiche Ergebnisse erzielt, sodass dies die Validität der Ergebnisse erhöht.

6 Zusammenfassung

Das Nebennierenkarzinom ist eine seltene Erkrankung mit einer limitierten Prognose. Bei zahlreichen Tumorentitäten wurde gezeigt, dass das Immunsystem entscheidenden Einfluss auf den Erkrankungsverlauf und die Prognose hat. Aufgrund der geringen Prävalenz gab es entsprechende Studien beim Nebennierenkarzinom bisher nicht. Dabei lag die Vermutung nahe, dass die Interaktion Tumor - Immunsystem beim Nebennierenkarzinom besonders ausgeprägt ist, da dieses häufig Glukokortikoide sezerniert, die bekanntermaßen stark die unterschiedlichen Immunzellen beeinflussen.

Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich, dass Patienten mit Nebennierenkarzinom (n=163) im Vergleich zu gesunden Probanden (n=19) eine signifikant erhöhte Frequenz regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut aufweisen (9,25% vs. 4,4%). Das Ausmaß des Glukokortikoid-Exzesses dagegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl dieser Immunzellen. Bezogen auf die Prognose war eine größere Anzahl regulatorischer T-Zellen im Blut mit einer schlechteren Prognose beim Nebennierenkarzinom assoziiert (HR für Tod: 1,8854 (95% CI 1,088-3,158), p=0,023).

Bei der Analyse des Tumoruminifiltrats (n=58) zeigte sich, dass Nebennierenkarzinome, ihre Rezidive und Metastasen durch CD8 positive zytotoxische T-Zellen, CD4 positive T-Helfer-Zellen, FoxP3 positive regulatorische T-Zellen und CD209 positive dendritische Zellen infiltriert werden. Insgesamt ist die Anzahl der Immunzellen im Tumor allerdings als relativ gering anzusehen. In der Korrelation des Immuninfiltrats mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Es zeigte sich lediglich bei den T-Helferzellen ein leichter Trend zu einem längeren Überleben, je größer das Immuninfiltrat war (HR für Tod 0,63 (95% CI: 0,305-1,291), p=0,205).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde speziell die Rolle von Glukokortikoiden in vivo auf regulatorische T-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich in einem Mausmodell, entgegen der Hypothese, dass Glukokortikoide Treg induzieren, dass die Behandlung gesunder Mäuse mit Dexamethason zu einem dosisabhängigen Abfall der absoluten Zahl der regulatorischen T-Zellen führte

(z. B. im Blut nach 3 Tagen: $1,3 \times 10^4$ in der 0,8 mg/kg Kohorte vs. $0,07 \times 10^4$ in der 100 mg/kg Kohorte), und sich dies auch bei der relativen Zahl der FOXP3-positiven T-Zellen bestätigte. Ähnlich fielen dann auch die Ergebnisse bei immunkompetenten Menschen aus. Hierbei kam es durch die 14-tägige Steroidgabe zwar zu einer milden T-Zell-Lymphozytose, allerdings war keine relevante Veränderung der Anzahl der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen zu erkennen; insbesondere kein Anstieg der Selben (z. B. Anteil der FOXP3-positiven T-Zellen 4,0% vs. 3,4%; $p < 0,05$). Damit widerlegen diese in vivo Daten die weitläufige Vermutung, dass eine kurzfristige Glukokortikoid-Gabe zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen führt.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass - wie bei anderen Tumoren auch - regulatorische T-Zellen bei Patienten mit Nebennierenkarzinom gehäuft vorkommen. Allerdings spielt hierbei der Glukokortikoid-Exzess der Tumore scheinbar keine wesentliche Rolle. Diese fehlende Interaktion zwischen den Steroiden und dieser Immunzell-Subpopulation bestätigt sich dann auch bei den in vivo Arbeiten an gesunden Mäusen und Menschen. Aus diesem Grund ist der Einfluss von Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen zumindest teilweise neu zu bewerten.

7 Literaturverzeichnis

- [1]K. Murphy, P. Travers, M. Walport, Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [2]R. Lüllmann-Rauch, Histologie, Georg Thieme Verlag, 2003.
- [3]W. Böcker, H. Denk, P.U. Heitz, Pathologie, Elsevier / Urban&Fischer, 2004.
- [4]M. Burnet, Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1 (1957) 779-786.
- [5]G.P. Dunn, A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber, Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3 (2002) 991-998.
- [6]G.P. Dunn, L.J. Old, R.D. Schreiber, The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22 (2004) 329-360.
- [7]G.P. Dunn, C.M. Koebel, R.D. Schreiber, Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 836-848.
- [8]V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, R.D. Schreiber, IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410 (2001) 1107-1111.
- [9]T. Karow, Lang R., Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Eigenverlag, 2007.
- [10]R.M. MacKie, R. Reid, B. Junor, Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med* 348 (2003) 567-568.
- [11]L. Zhang, J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, G. Coukos, Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348 (2003) 203-213.
- [12]M. Guidoboni, R. Gafa, A. Viel, C. Doglioni, A. Russo, A. Santini, L. Del Tin, E. Macri, G. Lanza, M. Boiocchi, R. Dolcetti, Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol* 159 (2001) 297-304.
- [13]Y. Naito, K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, H. Ohtani, CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58 (1998) 3491-3494.
- [14]C.G. Clemente, M.C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrada, P. Collini, N. Cascinelli, Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77 (1996) 1303-1310.
- [15]T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, W. Zou, Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10 (2004) 942-949.
- [16]M. Tavian, C. Robin, L. Coulombel, B. Peault, The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* 15 (2001) 487-495.
- [17]H. von Boehmer, F. Melchers, Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol* 11 (2010) 14-20.
- [18]T. Nagasawa, Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 107-116.
- [19]A.M. Vale, H.W. Schroeder, Jr., Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) 778-787.

- [20]F.E. Lund, T.D. Randall, Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 10 (2010) 236-247.
- [21]Q.M. Yu, C.D. Yu, Z.Q. Ling, Elevated circulating CD19+ lymphocytes predict survival advantage in patients with gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (2012) 2219-2224.
- [22]J.B. Hernandez, R.H. Newton, C.M. Walsh, Life and death in the thymus--cell death signaling during T cell development. *Curr Opin Cell Biol* 22 (2010) 865-871.
- [23]T.A. Potter, T.V. Rajan, R.F. Dick, 2nd, J.A. Bluestone, Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 337 (1989) 73-75.
- [24]G. Cammarota, A. Scheirle, B. Takacs, D.M. Doran, R. Knorr, W. Bannwarth, J. Guardiola, F. Sinigaglia, Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 356 (1992) 799-801.
- [25]M.L. Kripke, Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* 53 (1974) 1333-1336.
- [26]P.L. Ward, H.K. Koeppen, T. Hurteau, D.A. Rowley, H. Schreiber, Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8+ T-cell-dependent surveillance. *Cancer Res* 50 (1990) 3851-3858.
- [27]P. Yu, Y.X. Fu, Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 86 (2006) 231-245.
- [28]B. Mukherji, T.J. MacAlister, Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma. *J Exp Med* 158 (1983) 240-245.
- [29]A. Knuth, B. Danowski, H.F. Oettgen, L.J. Old, T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984) 3511-3515.
- [30]E. Klein, F. Vanky, U. Galili, B.M. Vose, M. Fopp, Separation and characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes in man. *Contemp Top Immunobiol* 10 (1980) 79-107.
- [31]G. Fossati, A. Anichini, G. Parmiani, Melanoma cell lysis by human CTL clones: differential involvement of T3, T8 and HLA antigens. *Int J Cancer* 39 (1987) 689-694.
- [32]J. Homsy, J.C. Grimm, P. Hwu, Immunotherapy of melanoma: an update. *Surg Oncol Clin N Am* 20 (2011) 145-163.
- [33]S.C. Katz, C. Donkor, K. Glasgow, V.G. Pillarisetty, M. Gonen, N.J. Espat, D.S. Klimstra, M.I. D'Angelica, P.J. Allen, W. Jarnagin, R.P. Dematteo, M.F. Brennan, L.H. Tang, T cell infiltrate and outcome following resection of intermediate-grade primary neuroendocrine tumours and liver metastases. *HPB (Oxford)* 12 (2010) 674-683.
- [34]C. Marx, G.W. Wolkersdorfer, J.W. Brown, W.A. Scherbaum, S.R. Bornstein, MHC class II expression--a new tool to assess dignity in adrenocortical tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996) 4488-4491.
- [35]S.A. Rosenberg, A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10 (1999) 281-287.
- [36]S.A. Rosenberg, Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 250 (2001) 462-475.
- [37]S.A. Rosenberg, Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411 (2001) 380-384.
- [38]M. Awwad, R.J. North, Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. A consequence of removing L3T4+ suppressor T cells from a host generating predominantly Lyt-2+ T cell-mediated immunity. *J Exp Med* 168 (1988) 2193-2206.

- [39]P. Yu, Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber, Y.X. Fu, Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 201 (2005) 779-791.
- [40]S. Liu, J. Lachapelle, S. Leung, D. Gao, W.D. Foulkes, T.O. Nielsen, CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* 14 (2012) R48.
- [41]S.M. Mahmoud, E.C. Paish, D.G. Powe, R.D. Macmillan, M.J. Grainge, A.H. Lee, I.O. Ellis, A.R. Green, Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29 (2011) 1949-1955.
- [42]Y.H. Kim, T.Y. Jung, S. Jung, W.Y. Jang, K.S. Moon, I.Y. Kim, M.C. Lee, J.J. Lee, Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br J Neurosurg* 26 (2012) 21-27.
- [43]C. Laurent, S. Muller, C. Do, T. Al-Saati, S. Allart, L.M. Larocca, S. Hohaus, S. Duchez, A. Quillet-Mary, G. Laurent, P. Brousset, S. Valitutti, Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood* 118 (2011) 5371-5379.
- [44]T.R. Mosmann, S. Sad, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17 (1996) 138-146.
- [45]S. Romagnani, The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18 (1997) 263-266.
- [46]D.M. Pardoll, S.L. Topalian, The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 10 (1998) 588-594.
- [47]G.B. Beck-Engeser, P.A. Monach, D. Mumberg, F. Yang, S. Wanderling, K. Schreiber, R. Espinosa, 3rd, M.M. Le Beau, S.C. Meredith, H. Schreiber, Point mutation in essential genes with loss or mutation of the second allele: relevance to the retention of tumor-specific antigens. *J Exp Med* 194 (2001) 285-300.
- [48]P.A. Monach, S.C. Meredith, C.T. Siegel, H. Schreiber, A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity* 2 (1995) 45-59.
- [49]D. Mumberg, P.A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A.Y. Toledano, R.D. Schreiber, H. Schreiber, CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 8633-8638.
- [50]G.L. Beatty, Y. Paterson, IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J Immunol* 165 (2000) 5502-5508.
- [51]P. Yu, M.T. Spiotto, Y. Lee, H. Schreiber, Y.X. Fu, Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med* 197 (2003) 985-995.
- [52]M.T. Spiotto, P. Yu, D.A. Rowley, M.I. Nishimura, S.C. Meredith, T.F. Gajewski, Y.X. Fu, H. Schreiber, Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17 (2002) 737-747.
- [53]Z. Lu, L. Yuan, X. Zhou, E. Sotomayor, H.I. Levitsky, D.M. Pardoll, CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 191 (2000) 541-550.
- [54]S.P. Schoenberger, R.E. Toes, E.I. van der Voort, R. Offringa, C.J. Melief, T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393 (1998) 480-483.
- [55]S.R. Bennett, F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, W.R. Heath, Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393 (1998) 478-480.
- [56]S.R. Bennett, F.R. Carbone, F. Karamalis, J.F. Miller, W.R. Heath, Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 186 (1997) 65-70.

- [57]M. Cella, D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, G. Alber, Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184 (1996) 747-752.
- [58]S. Shinde, Y. Wu, Y. Guo, Q. Niu, J. Xu, I.S. Grewal, R. Flavell, Y. Liu, CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L. *J Immunol* 157 (1996) 2764-2768.
- [59]F. Koch, U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, G. Schuler, High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 184 (1996) 741-746.
- [60]M.F. Mackey, J.R. Gunn, P.P. Ting, H. Kikutani, G. Dranoff, R.J. Noelle, R.J. Barth, Jr., Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154. *Cancer Res* 57 (1997) 2569-2574.
- [61]M.F. Mackey, J.R. Gunn, C. Maliszewsky, H. Kikutani, R.J. Noelle, R.J. Barth, Jr., Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 161 (1998) 2094-2098.
- [62]H.M. Hu, H. Winter, W.J. Urba, B.A. Fox, Divergent roles for CD4+ T cells in the priming and effector/memory phases of adoptive immunotherapy. *J Immunol* 165 (2000) 4246-4253.
- [63]E.M. Janssen, E.E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M.G. von Herrath, S.P. Schoenberger, CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421 (2003) 852-856.
- [64]D.J. Shedlock, H. Shen, Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300 (2003) 337-339.
- [65]J.C. Sun, M.J. Bevan, Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300 (2003) 339-342.
- [66]J.C. Sun, M.A. Williams, M.J. Bevan, CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5 (2004) 927-933.
- [67]M.J. Bevan, Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 595-602.
- [68]A.J. Zajac, J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, D.J. Sourdive, M. Suresh, J.D. Altman, R. Ahmed, Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188 (1998) 2205-2213.
- [69]P.G. Stevenson, G.T. Belz, J.D. Altman, P.C. Doherty, Virus-specific CD8(+) T cell numbers are maintained during gamma-herpesvirus reactivation in CD4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 15565-15570.
- [70]A. Aruga, E. Aruga, K. Tanigawa, D.K. Bishop, V.K. Sondak, A.E. Chang, Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J Immunol* 159 (1997) 664-673.
- [71]M.A. Lowes, G.A. Bishop, K. Crotty, R.S. Barnetson, G.M. Halliday, T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* 108 (1997) 914-919.
- [72]F. Fallarino, T.F. Gajewski, Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1. *J Immunol* 163 (1999) 4109-4113.
- [73]S. Ostrand-Rosenberg, M.J. Grusby, V.K. Clements, Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *J Immunol* 165 (2000) 6015-6019.

- [74]M. Kobayashi, H. Kobayashi, R.B. Pollard, F. Suzuki, A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol* 160 (1998) 5869-5873.
- [75]P. Pellegrini, A.M. Berghella, T. Del Beato, S. Cicia, D. Adorno, C.U. Casciani, Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol Immunother* 42 (1996) 1-8.
- [76]H.M. Hu, W.J. Urba, B.A. Fox, Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile. *J Immunol* 161 (1998) 3033-3041.
- [77]G. Cui, A. Yuan, R. Goll, T. Olsen, A. Husebekk, B. Vonen, J. Florholmen, Distinct changes of dendritic cell number and IL-12 mRNA level in adjacent mucosa throughout the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Immunol Immunother* 56 (2007) 1993-2001.
- [78]J. Wang, X. Zhang, S.M. Thomas, J.R. Grandis, A. Wells, Z.G. Chen, R.L. Ferris, Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene* 24 (2005) 5897-5904.
- [79]L. Gianotti, M. Sargenti, F. Galbiati, L. Nespoli, F. Brivio, M. Rescigno, A. Nespoli, Phenotype and function of dendritic cells and T-lymphocyte polarization in the human colonic mucosa and adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 34 (2008) 883-889.
- [80]K. Hung, R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, H. Levitsky, The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188 (1998) 2357-2368.
- [81]Y. Cho, M. Miyamoto, K. Kato, A. Fukunaga, T. Shichinohe, Y. Kawarada, Y. Hida, T. Oshikiri, T. Kurokawa, M. Suzuoki, Y. Nakakubo, K. Hiraoka, S. Murakami, T. Shinohara, T. Itoh, S. Okushiba, S. Kondo, H. Katoh, CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63 (2003) 1555-1559.
- [82]A. Fukunaga, M. Miyamoto, Y. Cho, S. Murakami, Y. Kawarada, T. Oshikiri, K. Kato, T. Kurokawa, M. Suzuoki, Y. Nakakubo, K. Hiraoka, T. Itoh, T. Morikawa, S. Okushiba, S. Kondo, H. Katoh, CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28 (2004) e26-31.
- [83]H.Y. Wang, D.A. Lee, G. Peng, Z. Guo, Y. Li, Y. Kuniwa, E.M. Shevach, R.F. Wang, Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20 (2004) 107-118.
- [84]I. Bursucker, R.J. North, Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. II. Failure to demonstrate postexcision immunity after the onset of T cell-mediated suppression of immunity. *J Exp Med* 159 (1984) 1312-1321.
- [85]S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155 (1995) 1151-1164.
- [86]S. Sakaguchi, M. Miyara, C.M. Costantino, D.A. Hafler, FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10 (2010) 490-500.
- [87]D.K. Sojka, Y.H. Huang, D.J. Fowell, Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124 (2008) 13-22.
- [88]J. Damschke, Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med* 64 (2006) 4-9.

- [89]A. McNeill, E. Spittle, B.T. Backstrom, Partial depletion of CD69^{low}-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand J Immunol* 65 (2007) 63-69.
- [90]T. Takahashi, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, S. Sakaguchi, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192 (2000) 303-310.
- [91]S. Read, V. Malmstrom, F. Powrie, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192 (2000) 295-302.
- [92]R.S. McHugh, M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, M.C. Byrne, CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16 (2002) 311-323.
- [93]N. Seddiki, B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, B. Fazekas de St Groth, Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203 (2006) 1693-1700.
- [94]W. Liu, A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, J.A. Bluestone, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203 (2006) 1701-1711.
- [95]J. Wieckiewicz, R. Goto, K.J. Wood, T regulatory cells and the control of alloimmunity: from characterisation to clinical application. *Curr Opin Immunol* 22 (2010) 662-668.
- [96]S. Hori, Developmental plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 22 (2010) 575-582.
- [97]C.L. Bennett, J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, H.D. Ochs, The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27 (2001) 20-21.
- [98]R.S. Wildin, F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, M.E. Brunkow, X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27 (2001) 18-20.
- [99]F. Martin, S. Ladoire, G. Mignot, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 29 (2010) 4121-4129.
- [100]E.Y. Woo, C.S. Chu, T.J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S.C. Rubin, L.R. Kaiser, C.H. June, Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61 (2001) 4766-4772.
- [101]U.K. Liyanage, T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, D.C. Linehan, Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169 (2002) 2756-2761.
- [102]E. Sato, S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, K. Odunsi, Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 18538-18543.

- [103]M. van den Broek, L. von Boehmer, A. Knuth, Developments in cancer immunotherapy. *Dig Dis* 28 (2010) 51-56.
- [104]Y. Mizukami, K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai, H. Fujii, Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 98 (2008) 148-153.
- [105]F. Pages, J. Galon, M.C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautes-Fridman, W.H. Fridman, Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29 (2010) 1093-1102.
- [106]Q. Gao, S.J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X.Y. Wang, Y.S. Xiao, Y. Xu, Y.W. Li, Z.Y. Tang, Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 25 (2007) 2586-2593.
- [107]P. Salama, M. Phillips, F. Grien, M. Morris, N. Zeps, D. Joseph, C. Platell, B. Iacopetta, Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27 (2009) 186-192.
- [108]T. Alvaro, M. Lejeune, M.T. Salvado, R. Bosch, J.F. Garcia, J. Jaen, A.H. Banham, G. Roncador, C. Montalban, M.A. Piris, Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 1467-1473.
- [109]J. Carreras, A. Lopez-Guillermo, B.C. Fox, L. Colomo, A. Martinez, G. Roncador, E. Montserrat, E. Campo, A.H. Banham, High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108 (2006) 2957-2964.
- [110]N. Hiraoka, K. Onozato, T. Kosuge, S. Hirohashi, Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 5423-5434.
- [111]A. Flammiger, L. Weisbach, H. Huland, P. Tennstedt, R. Simon, S. Minner, C. Bokemeyer, G. Sauter, T. Schlomm, M. Trepel, High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer* (2012).
- [112]F. Ghiringhelli, N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte, F. Martin, CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 34 (2004) 336-344.
- [113]J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (1998) 245-252.
- [114]D.N. Hart, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90 (1997) 3245-3287.
- [115]J.K. Tan, H.C. O'Neill, Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol* 78 (2005) 319-324.
- [116]L. Zitvogel, A. Tesniere, G. Kroemer, Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 715-727.
- [117]S. Miyagawa, J. Soeda, S. Takagi, S. Miwa, E. Ichikawa, T. Noike, Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer. *Hum Pathol* 35 (2004) 1392-1396.
- [118]L. Perez, M.R. Shurin, B. Collins, D. Kogan, I.L. Tourkova, G.V. Shurin, Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol* 20 (2005) 1165-1172.
- [119]J.A. Joyce, J.W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9 (2009) 239-252.

- [120]V. Umansky, A. Malyguine, B. Kotlan, N. Aptsiauri, M.R. Shurin, From cell regulation to patient survival: 2nd Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CITIM) meeting, Budapest, 2-5 May 2011. *Cancer Immunol Immunother* 61 (2012) 295-301.
- [121]A.R. Dadabayev, M.H. Sandel, A.G. Menon, H. Morreau, C.J. Melief, R. Offringa, S.H. van der Burg, C. Janssen-van Rhijn, N.G. Ensink, R.A. Tollenaar, C.J. van de Velde, P.J. Kuppen, Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother* 53 (2004) 978-986.
- [122]M.H. Sandel, A.R. Dadabayev, A.G. Menon, H. Morreau, C.J. Melief, R. Offringa, S.H. van der Burg, C.M. Janssen-van Rhijn, N.G. Ensink, R.A. Tollenaar, C.J. van de Velde, P.J. Kuppen, Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 2576-2582.
- [123]V. Sisirak, J. Faget, M. Gobert, N. Goutagny, N. Vey, I. Treilleux, S. Renaudineau, G. Poyet, S.I. Labidi-Galy, S. Goddard-Leon, I. Durand, I. Le Mercier, A. Bajard, T. Bachelot, A. Puisieux, I. Puisieux, J.Y. Blay, C. Menetrier-Caux, C. Caux, N. Bendriss-Vermare, Impaired IFN- α production by Plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T cell expansion and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res* (2012).
- [124]M. Gobert, I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A.C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J.Y. Blay, C. Menetrier-Caux, Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69 (2009) 2000-2009.
- [125]I. Treilleux, J.Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J.P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J.J. Pin, C. Barthelemy-Dubois, S. Lebecque, Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 7466-7474.
- [126]G. Erdag, J.T. Schaefer, M.E. Smolkin, D.H. Deacon, S.M. Shea, L.T. Dengel, J.W. Patterson, C.L. Slingluff, Jr., Immunity and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* 72 (2012) 1070-1080.
- [127]D. Nagorsen, S. Voigt, E. Berg, H. Stein, E. Thiel, C. Loddenkemper, Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 5 (2007) 62.
- [128]T.O. Jensen, H. Schmidt, H.J. Moller, F. Donskov, M. Hoyer, P. Sjoegren, I.J. Christensen, T. Steiniche, Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 118 (2012) 2476-2485.
- [129]P. Norgaard, H.S. Poulsen, Glucocorticoid receptors in human malignancies: a review. *Ann Oncol* 2 (1991) 541-557.
- [130]G.P. Chrousos, T. Kino, Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1179 (2009) 153-166.
- [131]N.E. Zanchi, M.A. Filho, V. Felitti, H. Nicastro, F.M. Lorenzetti, A.H. Lancha, Jr., Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation. *J Cell Physiol* 224 (2010) 311-315.
- [132]M.F. Dallman, A.M. Strack, S.F. Akana, M.J. Bradbury, E.S. Hanson, K.A. Scribner, M. Smith, Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol* 14 (1993) 303-347.

- [133]E. Martignoni, A. Costa, E. Sinforiani, A. Liuzzi, P. Chiodini, M. Mauri, G. Bono, G. Nappi, The brain as a target for adrenocortical steroids: cognitive implications. *Psychoneuroendocrinology* 17 (1992) 343-354.
- [134]G. Giannopoulos, Early events in the action of glucocorticoids in developing tissues. *J Steroid Biochem* 6 (1975) 623-631.
- [135]G.P. Löffler, P.E., *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer, 2003.
- [136]R.C. Gaillard, Interaction between the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the immunological system. *Ann Endocrinol (Paris)* 62 (2001) 155-163.
- [137]J.A. Da Silva, Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 876 (1999) 102-117; discussion 117-108.
- [138]D. Franchimont, Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 1024 (2004) 124-137.
- [139]G. Cox, Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154 (1995) 4719-4725.
- [140]M. Nakagawa, G.P. Bondy, D. Waisman, D. Minshall, J.C. Hogg, S.F. van Eeden, The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 93 (1999) 2730-2737.
- [141]R.P. Schleimer, B.S. Bochner, The effects of glucocorticoids on human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 94 (1994) 1202-1213.
- [142]C. Yoshimura, M. Miyamasu, H. Nagase, M. Iikura, M. Yamaguchi, O. Kawanami, Y. Morita, T. Iwata, K. Yamamoto, K. Hirai, Glucocorticoids induce basophil apoptosis. *J Allergy Clin Immunol* 108 (2001) 215-220.
- [143]A. van der Goes, K. Hoekstra, T.K. van den Berg, C.D. Dijkstra, Dexamethasone promotes phagocytosis and bacterial killing by human monocytes/macrophages in vitro. *J Leukoc Biol* 67 (2000) 801-807.
- [144]J. Galon, D. Franchimont, N. Hiroi, G. Frey, A. Boettner, M. Ehrhart-Bornstein, J.J. O'Shea, G.P. Chrousos, S.R. Bornstein, Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* 16 (2002) 61-71.
- [145]T.R. Cupps, L.C. Edgar, C.A. Thomas, A.S. Fauci, Multiple mechanisms of B cell immunoregulation in man after administration of in vivo corticosteroids. *J Immunol* 132 (1984) 170-175.
- [146]S.E. Segerer, N. Muller, J. van den Brandt, M. Kapp, J. Dietl, H.M. Reichardt, L. Rieger, U. Kammerer, Impact of female sex hormones on the maturation and function of human dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 62 (2009) 165-173.
- [147]J.P. Tuckermann, A. Kleiman, K.G. McPherson, H.M. Reichardt, Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42 (2005) 71-104.
- [148]P. Hench, Effects of cortisone in the rheumatic diseases. *Lancet* 2 (1950) 483-484.
- [149]T. Hirschberg, B. Randazzo, H. Hirschberg, Effects of methylprednisolone on the in vitro induction and function of suppressor cells in man. *Scand J Immunol* 12 (1980) 33-39.
- [150]T. Ikeda, M. Uchihara, Y. Daiguji, Y. Hasumura, J. Takeuchi, Immunological mechanisms of corticosteroid therapy in chronic active hepatitis: analysis of peripheral blood suppressor T-cell and interleukin 2 activities. *Clin Immunol Immunopathol* 48 (1988) 371-379.
- [151]C. Karagiannidis, M. Akdis, P. Holopainen, N.J. Woolley, G. Hense, B. Ruckert, P.Y. Mantel, G. Menz, C.A. Akdis, K. Blaser, C.B. Schmidt-Weber, Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114 (2004) 1425-1433.

- [152]J. Navarro, C. Aristimuno, S. Sanchez-Ramon, D. Vigil, M.L. Martinez-Gines, E. Fernandez-Cruz, C. de Andres, Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol* 176 (2006) 153-161.
- [153]M. Braitch, S. Harikrishnan, R.A. Robins, C. Nichols, A.J. Fahey, L. Showe, C.S. Constantinescu, Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 119 (2009) 239-245.
- [154]N.A. Azab, I.H. Bassyouni, Y. Emad, G.A. Abd El-Wahab, G. Hamdy, M.A. Mashahit, CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol* 127 (2008) 151-157.
- [155]F.J. Barrat, D.J. Cua, A. Boonstra, D.F. Richards, C. Crain, H.F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R.L. Coffman, C.M. Hawrylowicz, A. O'Garra, In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195 (2002) 603-616.
- [156]D. Drenckhahn, *Anatomie*, Elsevier / Urban&Fischer, 2004.
- [157]M.M. Grumbach, B.M. Biller, G.D. Braunstein, K.K. Campbell, J.A. Carney, P.A. Godley, E.L. Harris, J.K. Lee, Y.C. Oertel, M.C. Posner, J.A. Schlechte, H.S. Wieand, Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med* 138 (2003) 424-429.
- [158]G. Herold, u. Mitarbeiter, *Innere Medizin 2011*, Eigenverlag, 2010.
- [159]M. Classen, V. Diehl, K. Kochsiek, *Innere Medizin*, Elsevier / Urban&Fischer, 2004.
- [160]B.L. Wajchenberg, M.A. Albergaria Pereira, B.B. Medonca, A.C. Latronico, P. Campos Carneiro, V.A. Alves, M.C. Zerbini, B. Liberman, G. Carlos Gomes, M.A. Kirschner, Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 88 (2000) 711-736.
- [161]A.P. Dackiw, J.E. Lee, R.F. Gagel, D.B. Evans, Adrenal cortical carcinoma. *World J Surg* 25 (2001) 914-926.
- [162]B. Allolio, M. Fassnacht, Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 91 (2006) 2027-2037.
- [163]E. Kebebew, E. Reiff, Q.Y. Duh, O.H. Clark, A. McMillan, Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress? *World J Surg* 30 (2006) 872-878.
- [164]A.C. Koschker, M. Fassnacht, S. Hahner, D. Weismann, B. Allolio, Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114 (2006) 45-51.
- [165]G. Abiven, J. Coste, L. Groussin, P. Anract, F. Tissier, P. Legmann, B. Dousset, X. Bertagna, J. Bertherat, Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91 (2006) 2650-2655.
- [166]R. Libe, A. Fratticci, J. Bertherat, Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer* 14 (2007) 13-28.
- [167]W. Arlt, S. Hahner, R. Libe, e. al., Steroid profiling in the diagnosis and monitoring of adrenocortical cancer - results of the EURINE ACC Study of the European Network For The Study Of Adrenal Tumors (ENS@T). Abstracts of the 90th annual meeting of the Endocrine Society, San Francisco (2008) OR40-42.
- [168]S. Johanssen, M. Fassnacht, D. Brix, A.C. Koschker, S. Hahner, H. Riedmiller, B. Allolio, [Adrenocortical carcinoma. Diagnostic work-up and treatment]. *Urologe A* 47 (2008) 172-181.

- [169]M. Fassnacht, B. Allolio, Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23 (2009) 273-289.
- [170]J.P. Luton, S. Cerdas, L. Billaud, G. Thomas, B. Guilhaume, X. Bertagna, M.H. Laudat, A. Louvel, Y. Chapuis, P. Blondeau, et al., Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 322 (1990) 1195-1201.
- [171]A. Stojadinovic, R.A. Ghossein, A. Hoos, A. Nissan, D. Marshall, M. Dudas, C. Cordon-Cardo, D.P. Jaques, M.F. Brennan, Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. *J Clin Oncol* 20 (2002) 941-950.
- [172]S. Venkatesh, R.C. Hickey, R.V. Sellin, J.F. Fernandez, N.A. Samaan, Adrenal cortical carcinoma. *Cancer* 64 (1989) 765-769.
- [173]R. Vassilopoulou-Sellin, P.N. Schultz, Adrenocortical carcinoma. Clinical outcome at the end of the 20th century. *Cancer* 92 (2001) 1113-1121.
- [174]G. Assie, G. Antoni, F. Tissier, B. Caillou, G. Abiven, C. Gicquel, S. Leboulleux, J.P. Travagli, C. Dromain, X. Bertagna, J. Bertherat, M. Schlumberger, E. Baudin, Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2007) 148-154.
- [175]R. Morimoto, F. Satoh, O. Murakami, T. Suzuki, T. Abe, M. Tanemoto, M. Abe, A. Uruno, S. Ishidoya, Y. Arai, K. Takahashi, H. Sasano, S. Ito, Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocr J* 55 (2008) 49-55.
- [176]C.L. Ronchi, S. Sbiera, E. Leich, K. Henzel, A. Rosenwald, B. Allolio, M. Fassnacht, Single nucleotide polymorphism array profiling of adrenocortical tumors--evidence for an adenoma carcinoma sequence? *PLoS One* 8 (2013) e73959.
- [177]L. Barzon, C. Scaroni, N. Sonino, F. Fallo, A. Paoletta, M. Boscaro, Risk factors and long-term follow-up of adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1999) 520-526.
- [178]J. Wagner, C. Portwine, K. Rabin, J.M. Leclerc, S.A. Narod, D. Malkin, High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst* 86 (1994) 1707-1710.
- [179]A.M. McNicol, C.E. Nolan, A.J. Struthers, M.A. Farquharson, J. Hermans, H.R. Haak, Expression of p53 in adrenocortical tumours: clinicopathological correlations. *J Pathol* 181 (1997) 146-152.
- [180]J. Reibetanz, M. Kroiss, T. Deutschbein, W. Fenske, M. Gasser, C. Jurowich, C.T. Germer, B. Allolio, M. Fassnacht, [German adrenocortical carcinoma registry. Surgical therapy results and follow-up treatment]. *Chirurg* 83 (2012) 528-535.
- [181]M. Fassnacht, M. Kroiss, B. Allolio, Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* (2013).
- [182]M. Fassnacht, S. Hahner, B. Polat, A.C. Koschker, W. Kenn, M. Flentje, B. Allolio, Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91 (2006) 4501-4504.
- [183]B. Polat, M. Fassnacht, L. Pfreundner, M. Guckenberger, K. Bratengeier, S. Johanssen, W. Kenn, S. Hahner, B. Allolio, M. Flentje, Radiotherapy in adrenocortical carcinoma. *Cancer* 115 (2009) 2816-2823.
- [184]N.M. Milligan, R. Newcombe, D.A. Compston, A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50 (1987) 511-516.
- [185]J.H. Noseworthy, Treatment of multiple sclerosis and related disorders: what's new in the past 2 years? *Clin Neuropharmacol* 26 (2003) 28-37.

- [186]S. Wust, J. van den Brandt, D. Tischner, A. Kleiman, J.P. Tuckermann, R. Gold, F. Luhder, H.M. Reichardt, Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180 (2008) 8434-8443.
- [187]S. Wust, D. Tischner, M. John, J.P. Tuckermann, C. Menzfeld, U.K. Hanisch, J. van den Brandt, F. Luhder, H.M. Reichardt, Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* 4 (2009) e8202.
- [188]L. Liu, J. Yao, Q. Ding, S. Huang, CD4+CD25high regulatory cells in peripheral blood of NSCLC patients. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26 (2006) 548-551.
- [189]P. Cugini, P. Lucia, C. Letizia, G. Murano, S. Pieche, May a lymphocytic infiltration have a pathogenic role in an aldosterone-producing adrenal tumor? *Med Hypotheses* 17 (1985) 33-38.
- [190]N. Wada, M. Kubo, H. Kijima, Y. Yamane, T. Nishikawa, H. Sasano, T. Koike, A case of deoxycorticosterone-producing adrenal adenoma. *Endocr J* 42 (1995) 637-642.
- [191]E. Shinto, K. Hase, Y. Hashiguchi, A. Sekizawa, H. Ueno, A. Shikina, Y. Kajiwara, H. Kobayashi, M. Ishiguro, J. Yamamoto, CD8+ and FOXP3+ Tumor-Infiltrating T Cells Before and After Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 21 Suppl 3 (2014) 414-421.
- [192]J.F. Li, Y.W. Chu, G.M. Wang, T.Y. Zhu, R.M. Rong, J. Hou, M. Xu, The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int* 103 (2009) 399-405.
- [193]Y. Yamamoto, K. Backlin, H. Nakagomi, E. Halapi, C. Juhlin, A. Bucht, R. Kiessling, Cytotoxic activity and T cell receptor repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes of adrenal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 37 (1993) 163-168.
- [194]W. Wang, P. Hodgkinson, F. McLaren, A. MacKinnon, W. Wallace, S. Howie, T. Sethi, Small cell lung cancer tumour cells induce regulatory T lymphocytes, and patient survival correlates negatively with FOXP3+ cells in tumour infiltrate. *Int J Cancer* 131 (2012) E928-937.
- [195]M.V. Gulubova, J.R. Ananiev, T.I. Vlaykova, Y. Yovchev, V. Tsoneva, I.M. Manolova, Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 27 (2012) 159-169.
- [196]D.I. Gabilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 162-174.
- [197]L.M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature* 420 (2002) 860-867.
- [198]F.R. Greten, L. Eckmann, T.F. Greten, J.M. Park, Z.W. Li, L.J. Egan, M.F. Kagnoff, M. Karin, IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118 (2004) 285-296.
- [199]D. Pardoll, T cells and tumours. *Nature* 411 (2001) 1010-1012.
- [200]D. Pardoll, Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 807-839.
- [201]E. Pikarsky, R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431 (2004) 461-466.
- [202]J.W. Pollard, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 71-78.
- [203]S. Sbiera, T. Dexneit, S.D. Reichardt, K.D. Michel, J. van den Brandt, S. Schull, L. Kraus, M. Beyer, R. Mlynski, S. Wortmann, B. Allolio, H.M. Reichardt, M. Fassnacht, Influence of short-term glucocorticoid therapy on regulatory T cells in vivo. *PLoS One* 6 (2011) e24345.

- [204]X. Chen, J.J. Oppenheim, R.T. Winkler-Pickett, J.R. Ortaldo, O.M. Howard, Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 36 (2006) 2139-2149.
- [205]Y. Xie, M. Wu, R. Song, J. Ma, Y. Shi, W. Qin, Y. Jin, A glucocorticoid amplifies IL-2-induced selective expansion of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vivo and suppresses graft-versus-host disease after allogeneic lymphocyte transplantation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41 (2009) 781-791.
- [206]P. Stock, O. Akbari, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu, Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J Immunol* 175 (2005) 7380-7387.
- [207]M.K. Matyszak, S. Citterio, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 30 (2000) 1233-1242.
- [208]L. Xu, Z. Xu, M. Xu, Glucocorticoid treatment restores the impaired suppressive function of regulatory T cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 158 (2009) 26-30.
- [209]Y. Ling, X. Cao, Z. Yu, C. Ruan, Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol* 79 (2007) 310-316.
- [210]A. Fattorossi, A. Battaglia, A. Buzzonetti, F. Ciaraffa, G. Scambia, A. Evoli, Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Immunology* 116 (2005) 134-141.
- [211]Y.F. Zhu, X.H. Cai, J.Y. Zhu, W.P. Jiang, J.H. Lan, S. Liu, [Study of CD4+ CD25+ regulatory T cells and expression of Foxp3 mRNA in bronchiolitis and glucocorticoid regulation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 89 (2009) 1563-1566.
- [212]H.Y. Lee, Y.K. Hong, H.J. Yun, Y.M. Kim, J.R. Kim, W.H. Yoo, Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47 (2008) 789-794.
- [213]I. Screpanti, S. Morrone, D. Meco, A. Santoni, A. Gulino, R. Paolini, A. Crisanti, B.J. Mathieson, L. Frati, Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J Immunol* 142 (1989) 3378-3383.
- [214]R.L. Byyny, Withdrawal from glucocorticoid therapy. *N Engl J Med* 295 (1976) 30-32.
- [215]M.S. Greenberg, *Handbook of Neurosurgery*, Thieme Medical Publishers, New York, 2010.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Darstellung der Hormonregulation in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.....	15
Abbildung 2: Ficoll-Gradient; links vor Zentrifugation: das mit PBS verdünnte Blut auf den Ficoll-Gradient aufgetragen; rechts nach Zentrifugation: die Erythrozyten und Granulozyten haben sich am Boden abgesetzt, darüber das Ficoll-Medium, darüber befindet sich der Lympho- und Monozytenring darüber befinden sich das Plasma mit den Thrombozyten aus http://media.wiley.com/CurrentProtocols/CB/cb0202/cb0202-fig-0001-1-full.gif	25
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufes und der Medikation der Glukokortikoidstudie, Applikationsform und Dosierungen in Milligramm.....	35
Abbildung 4: Grafische Darstellung der Verteilung der regulatorischen T-Zellen bei Nebennierenkarzinompatienten (ACC) und der Kontrollgruppe gesunder Probanden; CS= Cushing Syndrom / tumorbedingter Cortisolexzess; Signifikanzniveau: *=p<0,05; **=p<0,01 ***=p<0,001.....	38
Abbildung 5: Überlebensraten in Abhängigkeit der Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut (Kaplan Meier).....	39
Abbildung 6: Überlebensraten in Abhängigkeit der Anzahl zirkulierender regulatorischer T-Zellen (p=0,023).....	39
Abbildung 7: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Tumorstadiums und des Steroidexzesses.....	40
Abbildung 8: Anzahl der CD3 positiven T-Lymphozyten pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe	41
Abbildung 9: Anzahl der CD4 positiven T-Lymphozyten pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe	42
Abbildung 10: Immunhistologische Färbung von CD3 (rot) und CD4 (grün) positiven T-Zellen im Nebennierenrindenzarzinom, Zellkerne blau.....	42
Abbildung 11: Anzahl der CD8 positiven T-Lymphozyten pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe	43

Abbildung 12: Immunhistologische Färbung von CD3 (rot) und CD8 (grün) positiven T-Zellen im Nebennierenrindenzinom, Zellkerne blau.....	43
Abbildung 13: Anzahl der FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und eine Tonsille als Kontrollgewebe.....	44
Abbildung 14: Immunhistologische Färbung von FoxP3 positiven (im Zellkern grüne Färbung), regulatorischen T-Zellen im Nebennierenrindenzinom, rote Färbung entspricht dem Marker CD3, Zellkerne blau.....	44
Abbildung 15: Anzahl der CD209 positiven dendritischen Zellen pro High Power Field (HPF) in Nebennierenkarzinomen; 7 Nebennierenadenome und ein Uterus als Kontrollgewebe.....	45
Abbildung 16: Immunhistologische Färbung von dendritischen Zellen im Nebennierenkarzinom, rote Färbung entspricht dem Marker CD209, Zellkerne blau, grün CD 19 (nicht vorhanden).....	45
Abbildung 17: Mediane Überlebensraten in Abhängigkeit der Größe des Immunfiltrates durch CD4 positive T-Zellen (Kaplan Meier); A Darstellung der Quartile 1-4, B Gegenüberstellung der Quartile 1+2 und 3+4.....	51
Abbildung 18: Mediane Überlebensraten in Abhängigkeit der Größe des Immunfiltrates durch CD209 positive dendritische Zellen (Kaplan Meier); A Darstellung der Quartile 1-4, B Gegenüberstellung der Quartile 1+2 und 3+4.....	52
Abbildung 19: Grafische Darstellung Glukokortikoidstudie im Mausmodell. A, C und E: zirkulierende Immunzellen bei verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen und nach 14-tägiger oraler Dosisreduktion; B, D und F Untersuchung der Immunzellen der Milz bei verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen und nach 14-tägiger oraler Dosisreduktion (A und B: CD4 ⁺ Zellen, C und D: FoxP3 ⁺ regulatorische T-Zellen, E und F: Anteil regulatorischer T-Zellen an den CD4 ⁺ Zellen), Signifikanzniveau: * p < 0,05 %, **p < 0,01 % n.s. = nicht signifikant aus Sbiera S, Dexneit T, Reichardt SD, Michel KD, van den Brandt J, et al. (2011) Influence of Short-Term Glucocorticoid Therapy on Regulatory T Cells <i>In Vivo</i> . PLoS ONE 6(9): e24345. doi:10.1371/journal.pone.0024345)	57
Abbildung 20: Regulatorische T-Zellen nach 3 Tagen (A,C,E,G) und nach 14 Tagen (B, D, F, H) Glukokortikoidstoßtherapie bei Hörsturzpatienten (aus Sbiera S, Dexneit T, Reichardt SD, Michel KD, van den Brandt J, et al. (2011) Influence of Short-Term Glucocorticoid Therapy on Regulatory T Cells <i>In Vivo</i> . PLoS ONE 6(9): e24345. doi:10.1371/journal.pone.0024345).....	60
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Ergebnisse des ACTH-Stimulationstests...	63

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktuelle ENSAT-Klassifikation für Nebennierenkarzinome.....	19
Tabelle 2: Verwendete Antikörper der Oberflächenfärbung.....	27
Tabelle 3: Verwendete Antikörper der intrazellulären Färbung.....	28
Tabelle 4: Verwendete Primär-Antikörperkombinationen der immunhistochemischen Färbungen.....	30
Tabelle 5: Verwendete Primär-Antikörperpaare der immunhistochemischen Färbungen.....	31
Tabelle 6: Verwendete Sekundär-Antikörper bei den immunhistochemischen Färbungen.....	31
Tabelle 7: Verwendete Antikörper der intra- und extrazellulären Färbung bei den Maus-Versuchen.....	34
Tabelle 8 Anzahl der Immunzellen pro HPF bei Nebennierenkarzinom, Nebennierenadenomen bzw. Kontrollgewebe.....	46
Tabelle 9: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD3 ⁺ Zellen (n=58).....	48
Tabelle 10: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD8 ⁺ Zellen (n=58).....	49
Tabelle 11: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD4 ⁺ Zellen (n=58).....	49
Tabelle 12: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD3 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen (n=58).....	50
Tabelle 13: Darstellung der Hazard Raten sowie des medianen Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei einem Immuninfiltrat durch CD209 ⁺ dendritische Zellen (n=28).....	50
Tabelle 14: Absolut- und Prozentzahlen vor und nach Dexamethasongabe im Blut in Mäusen.....	55
Tabelle 15: Absolut- und Prozentzahlen vor und nach Dexamethasongabe in der Milz in Mäusen.....	56
Tabelle 16: Absolutzahlen der Leukozyten im peripheren Blut vor und nach 2 Wochen Glukokortikoidtherapie.....	57
Tabelle 17: Prozentzahlen der Zellen im peripheren Blut vor nach 2 Wochen Glukokortikoidtherapie gemessen an den Leukozyten.....	60
Tabelle 18: Werte des ACTH-Stimulationstests.....	63

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Faßnacht-Capeller, der mir über die Jahre stets mit Rat und Tat als mein Betreuer zur Seite stand, mir mit sehr viel Verständnis entgegen kam und mir die Möglichkeit gab, in der Endokrinologie der Uniklinik Würzburg promovieren zu können. Vielen Dank für die gute Betreuung, Hilfen, Vorschläge, das Korrekturlesen und natürlich für die monetären Mittel, die mir für die Experimente zur Verfügung gestellt wurden.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. B. Allolio bedanken, in dessen Labor und mit dessen wundervollen Team ich arbeiten durfte.

Herrn Dr. rer. nat. Silviu Sbiera möchte ich auch sehr für seine kreativen Ideen, Tipps, Tricks und die aufgebrauchte Geduld danken. Durch ihn ist die Statistik kein Buch mit sieben Siegeln mehr!

Ein herzlicher Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Luitgard und Melanie, die mir in mühevoller Einzelarbeit das wissenschaftlich-praktische Arbeiten beibrachten und mir immer bei praktisch-technischen Fragen zur Seite standen. Des Weiteren geht mein Dank auch an die medizinisch-technischen Assistentinnen des Routine-Labors, die mich und meine Proben zu jeder Zeit mit einem Lächeln auf den Lippen und einen freundlichen Spruch in Empfang nahmen und die Proben auch zu später Stunde noch untersuchten.

Ein Dankeschön geht an die Korrekturleser Janet, Tilmann und meiner Mama, die mir halfen den Fehlerteufel zu verscheuchen.

Mein aufrichtiger Dank geht an meine Eltern und Großeltern! Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin - ohne Euch hätte ich nicht studieren können. Vielen Dank für die jahrelange Unterstützung in allen Lebenslagen!

Meiner lieben Frau Janet gilt zuletzt ein herzlicher Dank für die Unterstützung, die sie mir bei dem berufsbegleiteten Zusammenschreiben dieser Arbeit gegeben hat. Danke, dass du immer zu mir standest und für dein Verständnis, dass du neben der vielen Arbeit noch mehr Zeit durch das Schreiben dieser Arbeit auf mich verzichten musstest. Ich liebe dich!