

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt

***Molekulare Charakterisierung der immunologischen  
Veränderungen bei Patienten mit fortgeschrittenem  
Pankreaskarzinom unter einer palliativen  
Chemotherapie mit FOLFIRNOX oder  
Gemcitabin & nab-Paclitaxel***

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

vorgelegt von

Lauren Eleonore Sams

aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Böck
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Max Schnurr Prof. Dr. med. Christiane Bruns
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Stephan Kruger
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.03.2022

*Für meine Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1	Prävalenz und Einteilung .....	1
1.1.2	Therapie .....	3
1.2	Das menschliche Immunsystem .....	5
1.2.1	Einleitung in das menschliche Immunsystem sowie Differenzierung und Funktion von T-Zellen .....	5
1.2.2	Marker für den Funktionsstatus von T-Zellen.....	6
1.2.2.1	Regulatorische T-Zellen.....	6
1.2.2.2	Chemokinrezeptor 7.....	7
1.2.2.3	T-Zell Aktivierungsmarker .....	7
1.2.2.4	Immunecheckpoints .....	8
1.3	Immunevasion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas .....	10
1.3.1.	Immunologische Ansätze in der Therapie des Pankreaskarzinoms .....	11
1.3.2.	Kombination von immuntherapeutischen Ansätzen und Chemotherapie.....	12
1.4.	Zusammenfassung und Fragestellung der Arbeit.....	13
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1	Materialien.....	14
2.1.1	Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	14
2.1.2	Isolation von Ribonukleinsäure .....	15
2.1.3	Durchflusszytometrie .....	17
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Einschlusskriterien.....	19
2.2.2	Blutentnahmen .....	19
2.2.3	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripherem Blut, Zellzählung und Kryokonservierung .....	20
2.2.4	Zellzählung.....	21
2.2.5	Kryokonservierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	21
2.2.6	Isolation der Ribonukleinsäure mit dem <i>RNeasy Mini Kit, Quick-Start Protocol</i> von Qiagen.....	22
2.2.7	Durchflusszytometrie .....	23
2.2.7.1	Allgemeines Prinzip der Durchflusszytometrie.....	23
2.2.7.2	Ablauf der Durchflusszytometrie .....	24
2.2.8	Auswertung der Ergebnisse.....	25
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
3.1	Patientenpopulation .....	26
3.1.1	Klinische Daten.....	26
3.1.2	Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben .....	30
3.2	Ergebnisse der Isolation von Ribonukleinsäure.....	32
3.3	Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	33
3.3.1	Berechnung und Übersicht der Expression von T-Zellmarkern .....	34
3.3.2	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> Ratio.....	36
3.3.3	Regulatorische T-Zellen.....	37
3.3.4	Chemokinrezeptor 7.....	38
3.3.5	Aktivierungsmarker.....	39

3.3.6	<b>Imm checkpoints</b> .....	40
3.4	<b>Klinische Prognosefaktoren</b> .....	42
3.5	<b>Korrelation von Prognose und dynamischer Expression der untersuchten T-Zellmarker</b> .....	43
3.5.1	<b>CD4 und CD8 positive T-Zellen</b> .....	43
3.5.2	<b>FoxP3 positive regulatorische T-Zellen und T-Zell Aktivierungsmarker</b> .....	45
3.5.3	<b>Imm checkpoints</b> .....	47
3.5.3.1	<b>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</b> .....	47
3.5.3.2	<b>Programmed cell death protein 1</b> .....	48
3.5.3.3	<b>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</b> .....	49
4.	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b> .....	52
4.1	<b>Die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und Ribonukleinsäure</b> .....	52
4.2	<b>Einordnung und klinische Signifikanz der Patientencharakteristika</b> .....	53
4.3	<b>Veränderungen in der Expression von T-Zellmarkern</b> .....	56
4.4	<b>Prognostische Signifikanz der Veränderungen in T- Zellsubpopulationen, T- Zellaktivierungsmarkern sowie Imm checkpoints</b> .....	57
4.4.1	<b>CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio</b> .....	57
4.4.2	<b>Regulatorische T-Zellen</b> .....	57
4.4.3	<b>Chemokinrezeptor 7</b> .....	59
4.4.4	<b>Aktivierungsmarker</b> .....	59
4.4.5	<b>Imm checkpoints</b> .....	60
4.4.6	<b>Ausblick auf mögliche Kombinationen von immunmodulatorischen Antikörpern und etablierten Chemotherapieprogrammen</b> .....	63
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT</b> .....	64
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	67
	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b> .....	75
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	77
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	78
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.



# 1. Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Prävalenz und Einteilung

Mit circa 18 400 Neuerkrankungen im Jahr 2016 gehört das Pankreaskarzinom in Deutschland zu den häufigen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts (McGuigan 2018, Robert-Koch-Institut 2016). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren bei Männern und bei 76 Jahren bei Frauen, wobei beide Geschlechter nahezu gleich oft betroffen sind (Robert-Koch-Institut 2016). Histologisch handelt es sich in der Regel um Adenokarzinome, welche in circa 70% den Pankreaskopf betreffen (McGuigan 2018). Meist geht das Karzinom von den kleinen Pankreasgängen aus (duktales Adenokarzinom; englisch: *Pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) (90%), wobei der Ursprung selten (10%) auch das Azinusepithel (Azinuszellkarzinom) sein kann (Cheng 2018, McGuigan 2018). Karzinome, die sich aus der Papilla Vateri entwickeln, unterscheiden sich hinsichtlich Prognose und therapeutischem Vorgehen vom PDAC und werden daher häufig als eigenständige Entität behandelt. Man unterscheidet die Stadien gemäß der *Union for International Cancer Control* (UICC) wie der Tabelle 1 und 2 zu entnehmen ist. Die aktuelle Einteilung der Tumorstadien des Pankreaskarzinoms berücksichtigt unter anderem neue Erkenntnisse bezüglich der prognostischen Bedeutung der lokalen Tumorausdehnung („T“- Stadium) (Welsch 2018).

**Tabelle 1: Aktualisierte TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms gemäß der UICC; 8. Ausgabe**

<b>T1</b>	Tumor < 2cm
	T1a Tumor < 0,5 cm
	T1b Tumor >0,5 < 1 cm
	T1c Tumor >1 cm < 2cm
<b>T2</b>	Tumor >2 cm < 4 cm
<b>T3</b>	Tumor >4 cm in größter Ausdehnung
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Tr. coeliacus, A. mesenterica superior und / oder A. hepatis communis
<b>N1</b>	Metastasen in 1-3 Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten
<b>M</b>	Fernmetastasen

("The TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition" 2016)

**Tabelle 2: UICC Stadien des Pankreaskarzinoms gemäß der UICC; 8. Ausgabe**

Stadium (UICC 8. Ausgabe)	T Stadium	N Stadium	M Stadium
<b>Stadium IA</b>	T1a	N0	M0
<b>Stadium IB</b>	T1b	N0	M0
<b>Stadium II</b>	T2	N0	M0
<b>Stadium III A</b>	T 3	N0	M0
<b>Stadium III B</b>	T 4	N0	M0
<b>Stadium IV A</b>	Jedes T	N1	M0
<b>Stadium IV B</b>	Jedes T	Jedes N	M1

("The TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition" 2016, Ueno 2019)

Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms gelten Rauchen, Übergewicht, chronische Pankreatitis, zystische Neoplasien des Pankreas, Alkoholkonsum und die Erkrankung eines Verwandten ersten Grades (McGuigan 2018, Robert-Koch-Institut 2016). Pathogenetisch geht die Progression von Normalgewebe oder präneoplastischen Gangläsionen hin zum PDAC mit der Akkumulation diverser Genmutationen einher. Insbesondere erwähnenswert sind hier die aktivierende Punktmutationen des Onkogens KRAS (*Kirsten rat sarcoma virus*) sowie die

inaktivierende Mutationen der Tumorsuppressorgene p53, p16 und DPC4 (*Deleted in pancreatic cancer 4*) (McGuigan 2018).

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 5-10% stellt das Pankreaskarzinom deutschlandweit den Tumor mit der höchsten Mortalität dar (Quante 2016). Gründe für die schlechte Überlebensrate sind unter anderem die anfängliche Symptomarmut sowie die aggressive Tumorbilologie mit frühzeitiger Metastasierung (Quante 2016). Aktuell ist das PDAC in Deutschland die vierthäufigste krebbedingte Todesursache. Epidemiologische Prognosen gehen davon aus, dass das PDAC weiter an Relevanz gewinnen und bis 2030 die zweithäufigste krebbedingte Todesursache in Deutschland darstellen könnte (Quante 2016).

### 1.1.2 Therapie

Die Therapie des Pankreaskarzinoms erfolgt gemäß dem Tumorstadium, wobei nur im Falle einer Resektabilität des Tumors (10-20% der Patienten) von einem kurativen Ansatz ausgegangen werden kann (Tempero 2017). Da die meisten Pankreaskarzinome den Pankreaskopf befallen, ist die klassische Kausch-Whipple-Operation oder die pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie das operative Verfahren der Wahl (McGuigan 2018, Tempero 2017). Bei einer anderen Tumorlokalisation, zum Beispiel im Pankreasschwanz, kann eine Pankreaslinksresektion oder in seltenen Fällen auch eine totale Pankreatektomie notwendig werden (Loos 2008, Tempero 2017). Bei der Mehrzahl der Patienten besteht zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits ein lokal inoperabler Tumor oder eine metastasierte Tumorerkrankung. In diesen fortgeschrittenen Stadien ist eine chirurgische Therapie grundsätzlich nicht als sinnvoll zu erachten (Shrikhande 2007, Tempero 2017). Lange Zeit stellte in diesem Stadium eine rein symptomatische Behandlung die einzige Behandlungsmöglichkeit dar. Burris und Kollegen konnten 1997 erstmals zeigen, dass eine Chemotherapie mit dem Nukleosid-Analogen Gemcitabin in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms zu einer Verbesserung von Lebensqualität und medianem Gesamtüberleben führen kann (Burris 1997). Moore und Kollegen konnten 2007 zeigen, dass durch Kombination von Gemcitabin mit Erlotinib eine statistisch zwar signifikante, jedoch klinisch nur unwesentliche Verlängerung des medianen Überlebens von zwei Wochen und ein Anstieg des Ein-Jahres Überlebens von 17% auf 23% erreicht werden kann (Moore 2007). Interessant ist dabei, dass insbesondere Patienten, welche einen Hautausschlag unter Erlotinib

entwickeln von dieser Therapie profitieren (Moore 2007). Heute wird Erlotinib aufgrund des moderaten Zusatznutzens nur noch in Einzelfällen verwendet (Scheithauer 2019).

Für Patienten in gutem Allgemeinzustand und guter Organfunktion konnte durch die Entwicklung von intensiven Kombinationstherapien eine deutliche Verbesserung der Prognose erreicht werden (Christenson 2020). Durch die Kombination von Gemcitabin & nab Paclitaxel (Gem / nab-Pac) kann eine Verbesserung der Ein-Jahres Überlebensrate von 22% auf 35% im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie erreicht werden (Von Hoff 2013). Die Kombinationstherapie zeigte jedoch eine erhöhte Rate an Nebenwirkungen (Neutropenie: 27 versus 38%; Fatigue: 7 versus 17%; Neuropathie: 1 versus 17%; febrile Neutropenie: 1 versus 3%) (Von Hoff 2013).

Eine weitere Therapieoption für Patienten mit metastasiertem PDAC in gutem Allgemeinzustand stellt das FOLFIRINOX-Schema (Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan und Folsäure) dar (Conroy 2011). Im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie zeigte sich unter FOLFIRINOX eine Zunahme des Gesamtüberlebens von 6,8 Monaten auf 11,1 Monate (Conroy 2011). Unter FOLFIRINOX gaben zwar wesentlich mehr Patienten Nebenwirkungen an, dennoch verzeichneten unter dieser Therapie nach sechs Monaten signifikant weniger Patienten (31%) eine Abnahme der Lebensqualität als unter Gemcitabin Monotherapie (66%) (Conroy 2011).

Neueste Studien haben Unterschiede im Gesamtüberleben bei Patienten mit FOLFIRINOX und Gemcitabin nab-Paclitaxel untersucht (Macedo 2019, Williet 2019). Insgesamt betrachtet stehen jedoch bisher keine prospektiven Daten zum direkten Vergleich der beiden Chemotherapieprotokolle beim lokal-fortgeschrittenen oder metastasierten PDAC zur Verfügung (Christenson 2020). Erwähnt werden sollte, dass die Einschlusskriterien für eine Therapie mit FOLFIRINOX deutlich enger gefasst sind (Alter < 75 Jahre, Bilirubinwert < 1,5-facher Normwert oder einem ECOG 0-1, > 100 000 Thrombozyten/ $\mu$ l, > 1500 Granulozyten/ $\mu$ l) (Conroy 2011). Somit ist ein direkter Vergleich der Studiendaten schwierig und die optimale Behandlungsstrategie für Patienten mit fortgeschrittenem PDAC weiterhin nicht einheitlich definiert (Christenson 2020, Macedo 2019, Tempero 2017).

## 1.2 Das menschliche Immunsystem

### 1.2.1 Einleitung in das menschliche Immunsystem sowie Differenzierung und Funktion von T-Zellen

Für das menschliche Immunsystem existieren eine Vielzahl von Einteilungsmöglichkeiten. Unter anatomisch-strukturellen Gesichtspunkten kann beispielsweise eine basale Einteilung in anatomische Barrieren, Proteine und zelluläre Bestandteile vorgenommen werden. Nach funktionellen Aspekten wird häufig zwischen einer angeborenen und einer erworbenen Komponente des Immunsystems unterschieden.

Das angeborene Immunsystem besteht aus Makrophagen, Komplementsystem, Granulozyten und natürlichen Killerzellen. Diese erkennen Pathogene hauptsächlich über sogenannte *Pattern recognition receptors* (PRR) wie *Toll-like-Rezeptoren* oder *RIG-I-like-Rezeptoren* (Takeuchi 2010). Diese wiederum erkennen *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) wie beispielsweise bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und setzen mittels proinflammatorischer Zytokine eine Abwehrreaktion in Gang (Takeuchi 2010).

Das erworbene Immunsystem besteht hauptsächlich aus B- und T-Lymphozyten, die über verschiedene Mechanismen wichtige Aufgaben in der Bekämpfung von Bakterien, Viren, Pilzen und Tumorzellen übernehmen. B-Zellen entwickeln sich hauptsächlich im Knochenmark und können sich, wenn sie in die Blutbahn gelangen und im Lymphknoten aktiviert werden, zu Plasmazellen differenzieren und so eine große Menge Antikörper zur Abwehr von Pathogenen produzieren. Die Entstehung dieser hochspezialisierten Antikörper über somatische Rekombination eröffnet die Möglichkeit einer gezielten Immunabwehr (Sankawa 2014).

Auf der anderen Seite stehen die T-Zellen, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Aktivierung von B-Zellen spielen. Bei diesen kommt es noch während ihrer Reifung im Thymus zur Expression der Membranproteine *Cluster of differentiation* (CD) 3 sowie CD4 und CD8. CD3 nimmt eine besondere Rolle ein, da es von Beginn an im Zytoplasma der T-Zellen nachweisbar ist und somit als Erkennungsmerkmal von T-Zellen über alle Zellentwicklungsstufen gilt. CD4<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln sich hauptsächlich zu sogenannten T-Helferzellen, deren Aufgabe im Wesentlichen in der Aktivierung von

Makrophagen und B-Zellen besteht. Die Expression von CD8 ist charakteristisch für zytotoxische T-Zellen, die infizierte körpereigene Zellen und Tumorzellen abtöten können. Eine weitere Gruppe der T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (sogenannte *Tregs*), deren Funktion hauptsächlich in der Suppression einer überschießenden Immunantwort besteht. Diese charakteristischen Eigenschaften erlangen die *Tregs* in erster Linie über den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor *Forkhead box P3* (FoxP3), der bestimmte Gene zur Hemmung der Immunantwort aktiviert (Josefowicz 2012).

Aufgrund komplexer Interaktionen zwischen angeborenen und erworbenen Komponenten besitzt das Immunsystem die Fähigkeit körpereigene von fremden Zellen zu unterscheiden und dient damit nicht nur der Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Pilzen oder Viren sondern auch der Erkennung und Eliminierung von maligne entarteten Zellen (Sankawa 2014).

## 1.2.2 Marker für den Funktionsstatus von T-Zellen

Die T-Zell-vermittelte Immunantwort basiert auf dem Zusammenspiel aktivierender und hemmender Signale (McCoy 1999). Viele dieser Signale werden mittels verschiedener Moleküle auf der Oberfläche von T-Zellen vermittelt, die Rückschlüsse auf den Funktionsstatus der Zellen erlauben. Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten T-Zellmarker aufgeführt. Dabei wurde eine Einteilung in Marker für regulatorische T-Zellen, Aktivierungsmarker sowie die sogenannte „Immuncheckpoints“ vorgenommen. Immuncheckpoints stellen eine Gruppe immunregulatorischer T-Zellrezeptoren dar, die für Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts bedeutend sind und überschießende Immunreaktionen verhindern. Maligne Tumoren verwenden Immuncheckpoints, um einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Therapeutisch wichtige Vertreter sind PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) und CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*).

### 1.2.2.1 Regulatorische T-Zellen

Forschungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass **FoxP3** (*Forkhead box protein 3*) eine wichtige Rolle in der Homöostase des Immunsystems spielt, da es essentiell für die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und deren inhibitorische Funktion ist (Josefowicz 2012). Der genaue Mechanismus dieser Suppressorfunktion ist nicht

bekannt, wird jedoch unter anderem über die Freisetzung von TGF (*Transforming growth factor  $\beta$* ) und IL-10 (Interleukin 10) vermittelt (Josefowicz 2012, Kunk 2016). Es konnte gezeigt werden, dass im Fall des PDAC erhöhte Level von zirkulierenden regulatorischen T-Zellen mit einem Progress der Tumorerkrankung unter Chemotherapie assoziiert sind (Liu 2017). Weitere Untersuchungen von FoxP3 in Patienten mit PDAC konnten belegen, dass auch die Tumorzellen zum Teil FoxP3 exprimieren (sog. *cancer-FoxP3*). Eine erhöhte cFOXP3 Expression war in der genannten Studie mit einem schlechteren Gesamtüberleben sowie einer zunehmenden Tumorgröße (bezogen auf das „T“ Stadium gemäß der TNM Klassifikation) assoziiert (Wang 2017).

### 1.2.2.2 Chemokinrezeptor 7

**CCR7** (Chemokinrezeptor 7) und seine Liganden CCL19 (Chemokinligand 19) und CCL21 (Chemokinligand 21) spielen eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Immunität und Toleranz (Forster 2008). Die Expression von CCR7 auf T-Lymphozyten dient der Adhäsion an Endothel sowie der transendothelialen Migration in die Lymphknoten (Forster 2008). Des Weiteren dient CCR7 auf T-Lymphozyten der Interaktion mit dendritischen Zellen, wodurch eine Antigen-spezifische Aktivierung erreicht werden kann (Forster 2008). Bezüglich prognostischer Relevanz der CCR7 Expression konnte gezeigt werden, dass im Fall des PDAC die CCR7 Expression im Tumorgewebe ein negativ prognostischer Faktor ist (Nakata 2008).

### 1.2.2.3 T-Zell Aktivierungsmarker

**CD62L** oder auch L-Selectin genannt, wird auf nativen T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Neutrophilen und natürlichen Killerzellen exprimiert und dient deren Adhäsion an die Gefäßwand sowie der Einwanderung in sekundäres lymphatisches Gewebe (Borsig 2002, Ivetic 2018, Kohn 2012, Yago 2004). Werden naive T-Zellen aktiviert und entwickeln sich zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen kommt es zu einer Abnahme der CD62L Expression (Sallusto 2004). Daher kann CD62L als sogenannter „invertierter Aktivierungsmarker“ betrachtet werden. Zusätzlich kommt CD62L eine wichtige Bedeutung in der Metastasierung von Tumorzellen zu (Borsig 2002). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine CD62L-Expression auf Tumorzellen die Metastasierungsneigung erhöhen kann (Borsig 2002, Qian 2001).

**CD69** wird auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, aber auch natürlichen Killerzellen, B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten exprimiert (Ziegler 1993). Obwohl CD69 typischerweise als Aktivierungsmarker beschrieben wurde, zeigen neuere Untersuchungen, dass es ebenfalls eine immunregulatorische Funktion haben kann (Sancho 2005). Diese entfaltet es unter anderem über eine Regulation der Freisetzung von *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) (Sancho 2005). Bei Patienten mit PDAC konnte sowohl im peripheren Blut als auch im Tumorgewebe eine erhöhte Menge an CD4<sup>+</sup> Zellen mit hoher CD69 und fehlender CD25 Expression nachgewiesen werden (Grage-Griebenow 2014). Diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> T-Zell Population korreliert mit verstärktem Tumorstadium und höheren Tumorstadien (Grage-Griebenow 2014, Grage-Griebenow 2014, Sancho 2005).

#### 1.2.2.4 **Imm checkpoints**

*Imm checkpoints* sind Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen. Physiologischerweise wird die Expression von *Imm checkpoints* durch eine länger anhaltender T-Zellaktivierung ausgelöst. Sie verhindern dadurch in gesunden Menschen die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Jedoch können auch maligne Tumoren die entsprechenden Liganden exprimieren und so einer wirksamen T-Zellantwort gegen den Tumor entgegenwirken. *Imm checkpoints* sind auch ein Marker für die sogenannte *T-cell exhaustion*,, welche einen Zustand von unterdrückter T-Zell Antwort und eine T-Zell Dysfunktion beschreibt, wie sie durch Tumorerkrankungen und chronische Infektionen entstehen kann (Das 2017, Diana 2016, Wherry 2015). *T cell exhaustion* konnte auch in Zusammenhang mit der Expression von CTLA-4, PD-1, LAG-3 und TIM-3 nachgewiesen werden (Andrews 2017, Bian 2019, Wherry 2015). Im Jahr 2018 wurde der Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung von CTLA-4 und PD-1 verliehen.

**CTLA-4** (*Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*) ist ein Oberflächenmolekül, welches nahezu ausschließlich auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere *Tregs* und aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Bensch 2017, McCoy 1999). CTLA-4 ist homolog zu CD28 und bindet die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen (Cheng 2018). Wird eine T-Zelle aktiviert, so exprimiert sie CTLA-4 auf ihrer Oberfläche. Da CTLA-4 im Vergleich zu CD28 eine höhere Affinität zu CD80 und CD86 besitzt, wird eine Interaktion zwischen CD28 und den vorgenannten kostimulatorischen Molekülen unterbunden (Cheng 2018). Somit

verhindert CTLA-4 eine weitere Aktivierung von T-Zellen. Dies dient physiologischerweise der Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion. Im Falle des PDAC konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 eine wichtige Rolle in der Ausbildung eines immunsuppressiven Tumormicroenvironments spielt (Bengsch 2017, Kunk 2016).

**PD-1** (*Programmed cell death protein 1*) spielt eine wichtige Rolle im programmierten Zelltod und wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Bengsch 2017, Cheng 2018, Ishida 1992). PD-1 bindet an seinen Liganden, PD-L1, der insbesondere auf Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen vorkommt (Diana 2016). PD-1 und PD-L1 bilden eine Rezeptor-Ligand Interaktion, die die Immunantwort herunterreguliert und die Proliferation von T-Zellen hemmt (Diana 2016, Freeman 2000).

**LAG-3** (*Lymphocyte-activation gene 3*) ist ein weiteres immunregulatorisches Molekül, welches auf aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird (Triebel 1990). LAG-3 bindet an den *Major histocompatibility complex II* (MHC II) auf antigenpräsentierenden Zellen mit einer höheren Affinität als der T-Tellrezeptor-Komplex (Huard 1994). Dadurch hemmt es T-Zellproliferation und reguliert die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen herab (Huard 1994).

**TIM-3** (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) wird auf T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Die erhöhte Expression von TIM-3 auf tumorinfiltrierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen ist bei mehreren Tumoren wie dem Magenkarzinom und dem NSCLC (*Non small cell lung cancer*) mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Gao 2012, Wang 2018).

### 1.3 Immunevasion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Maligne Tumorzellen können von Zellen des Immunsystems anhand der Expression von Neoantigenen erkannt werden (Swann 2007). Im Laufe der Tumorentstehung entwickeln maligne Zellen jedoch die Fähigkeit die Erkennung durch das Immunsystem zu umgehen. Dieser Prozess wird als „*Immunoediting*“ bezeichnet (Dunn 2002, Sahin 2017). Er ist die Folge komplexer Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem. Zu Beginn der Tumorentstehung kann das Immunsystem das Tumorwachstum noch unterdrücken (Eliminierung) beziehungsweise ein Gleichgewicht zwischen der Abtötung von Tumorzellen und Tumorwachstum (*Equilibrium*) aufrechterhalten (vgl. Abb.1) (Vesely 2011). In der letzten Phase des *Immunoediting* gelingt es dem Immunsystem nicht mehr das Tumorwachstum zu kontrollieren, der Tumor „entkommt“ der Erkennung durch das Immunsystem (*Escape*) und kann ungehindert wachsen (vgl. Abb. 1) (Sankawa 2014).

Die Anwesenheit von immunsuppressiven Zellen ist sowohl im peripheren Blut als auch im Tumor selbst nachweisbar (Bian 2019, Farren 2016, Ino 2013, Kunk 2016) (siehe dazu auch Abschnitt 1.2.2). Das PDAC schafft sich ein besonders immunsuppressives *Microenvironment* (Kunk 2016, Sahin 2017). Dieses *Microenvironment* ist charakterisiert durch einen Mangel an Effektor T-Zellen und eine ausgeprägte Infiltration durch verschiedene immunsuppressive Immunzellpopulationen. Translationale Studien konnten zeigen, dass eine Infiltration des Tumors durch regulatorischen T-Zellen oder myeloischen Suppressorzellen wie M2 Makrophagen mit einem kürzeren krankheitsfreien- und Gesamtüberleben assoziiert ist (D'Angelo 2019, Ino 2013).

Bemerkenswert ist auch der desmoplastische Umbau im Umfeld des PDAC, infolgedessen sich eine Barriere aus verschiedenen Zelltypen, extrazellulärer Matrix und molekularen Faktoren wie Fibronectin, Hyaluronsäure und PDGF (*Platelet derived growth factor*) bildet und somit eine Infiltration durch Immunzellen verhindert (Feig 2012, Kunk 2016).

Dieses Bild kann aus urheberrechtlichen Gründen nicht gezeigt werden

**Abbildung 1: *Cancer immunoediting*** Der Prozess der Immunevasion („*Escape*“- *Roter Rahmen*) stellt dar wie maligne Tumoren einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen können. Abbildung modifiziert nach (Vesely 2011).

### 1.3.1. Immunologische Ansätze in der Therapie des Pankreaskarzinoms

Die immunologischen Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem haben sich mittlerweile als wichtiger Ansatzpunkt in der Tumorthherapie etabliert. Beispielsweise zeigen monoklonale Antikörper gegen PD-1 oder PD-L1 in der Therapie des malignen Melanoms oder des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beeindruckende Ergebnisse (Ciardiello 2019, Farkona 2016, Hodi 2010). Auch CTLA-4 Antikörper haben bei Erkrankungen wie dem malignen Melanom oder dem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom eine deutlich Verbesserung der Prognose bewirkt (Torphy 2018, Yang 2007). Im Falle des PDAC hingegen war bislang kein therapeutischer Effekt für einen immun-onkologischen Behandlungsansatz nachzuweisen (Kunk 2016). Die Gabe von PD-1 Antikörpern mit und ohne CTLA-4 Antikörper bei Patienten mit metastasiertem PDAC konnte keine Verbesserung der Prognose bewirken (O'Reilly

2019). Zudem haben bisherige Versuche die Therapie des PDAC mit Gemcitabin um ein LAG-3 Inhibitor zu erweitern keinen Vorteil für die Patienten ergeben (Wang-Gillam 2013). Als mögliche Erklärung für die Ineffektivität von Checkpoint-Inhibitoren beim PDAC gilt das immunsuppressive *Microenvironment* des PDAC sowie die geringe Dichte an T-Zellen im Tumorgewebe des PDAC (Fukunaga 2004, Torphy 2018, Winograd 2015). Diese scheint insbesondere mit der geringen Mutationslast und der folglich schwachen Immunogenität des Tumors zusammenzuhängen (Alexandrov 2013, Wang 2015).

### **1.3.2. Kombination von immuntherapeutischen Ansätzen und Chemotherapie**

In Anbetracht dessen ist es interessant, ob Chemotherapeutika mit diesen immunologischen Prozessen interagieren und möglicherweise die Immunogenität des Tumors erhöhen könnten. Aus präklinischen Arbeiten ist schon längere Zeit bekannt, dass Chemotherapeutika über den sogenannten immunogenen Zelltod eine Reaktion des Immunsystems gegen den Tumor induzieren können (Hato 2014, Liu 2010, Opzoomer 2019). Sowohl für Gemcitabin, Oxaliplatin als auch Fluorouracil konnten (präklinisch) immunologische Effekte nachgewiesen werden, die letztlich zur Einwanderung von zytotoxischen T-Zellen und der Zerstörung von malignen Tumorzellen führen (Duffy 2014, Hato 2014). Hinsichtlich der immunologischen *in vivo* Effekte von Chemotherapeutika bei Patienten mit Pankreaskarzinom stehen dagegen bislang nur sehr eingeschränkt Daten zur Verfügung. Sollten sich die präklinischen Beobachtungen bezüglich der immunogenen Wirkung auch *in vivo* bestätigen, so könnten diese als Grundlage für die Entwicklung von wirksamen Kombinationen aus Checkpoint-Blockade und Chemotherapie für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom genutzt werden. Daher erscheint es (klinisch und wissenschaftlich) bedeutsam, das bisher nur unzureichend untersuchte Gebiet der immunologischen Veränderung in Patienten mit PDAC unter systemischer Chemotherapie genauer zu untersuchen.

## 1.4. Zusammenfassung und Fragestellung der Arbeit

Immunmodulatorische Therapeutika können bei verschiedenen soliden Tumorerkrankungen beeindruckende Ansprechraten erzielen (Farkona 2016). Insbesondere sind hier die sogenannten *Checkpoint*-Inhibitoren zu nennen, welche CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen als Angriffspunkte haben (Pardoll 2012). Bisherige klinische Studien mit *Checkpoint*-Inhibitoren für Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas waren jedoch nicht erfolgreich (O'Reilly 2019). Als mögliche Gründe kommen insbesondere das immunsuppressive PDAC *Mikroenvironment* sowie eine im Schnitt eher unterdurchschnittliche Mutationslast des PDAC in Frage (Cheng 2018). So bleibt das fortgeschrittene PDAC trotz intensiver Forschungsanstrengungen weiterhin eine Krankheit mit infauster Prognose. Um die therapeutischen Möglichkeiten zu erweitern, werden Versuche unternommen, etablierte Chemotherapie-Regime wie Gemcitabin plus nab-Paclitaxel oder FOLFIRINOX (Folsäure, Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin) mit *Checkpoint*-Inhibitoren zu kombinieren (Aglietta 2014). Um effektive Kombinationstherapien zu entwickeln, ist es essentiell ein besseres Verständnis der immunologischen Effekte von Therapieprotokollen wie FOLFIRINOX oder Gemcitabin & nab-Paclitaxel zu erlangen. Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, welchen Einfluss die vorgenannten Zytostatika auf *Immuncheckpoint*-Moleküle und T-Zell Aktivierungs-, Regulierungs- und Differenzierungsmarker von Patienten mit PDAC haben. Aufgrund der leichten Verfügbarkeit und geringen Invasivität haben wir uns in der vorliegenden Arbeit auf T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit PDAC fokussiert. Die Arbeit gliedert sich folgendermaßen:

- A. Im ersten Teil wird die Etablierung einer Methode zur Gewinnung und Kryoasservierung von *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) aus Blutproben von Patienten mit fortgeschrittenem PDAC beschrieben. Zudem wurde RNA aus PBMC gewonnen.
- B. Im zweiten Teil wurde die Expression verschiedener T-Zellmarker auf PBMC zu Beginn und einen Monat nach Beginn der Chemotherapie (FOLFIRINOX oder Gemcitabin & nab-Paclitaxel) mittels Durchflusszytometrie untersucht.
- C. Im letzten Abschnitt wurden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit klinischen Patientendaten korreliert, um mögliche Assoziationen zwischen den untersuchten T-Zellmarkern und dem klinischen Verlauf aufzudecken.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

**Tabelle 3: Geräte für die Isolation von PBMC**

Gerät	Hersteller
50 ml Gefäß	Sarstedt (Nürmbrecht, D)
Stripette	Corning Inc, (New York, USA)
<i>Hera Safe Air Flow</i>	Kendro (Hanau, D)
Pipetus	Hirschmann (Eberstadt, D)
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>CryoPure</i> Gefäß 1,6 ml	Sarstedt (Nürmbrecht, D)
-80 °C Kühlschrank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hoshizaki <i>Ice Maker</i>	Hoshizaki (Toyoake, Jap.)
Vi-CELL XR	Beckman-Coulter (Brea, USA)

**Tabelle 4: Materialien für die Isolation von PBMC**

Material	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Honeywell (St. Louis, USA)
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS) Dulbecco	Biochrom GmbH (Berlin, D)
<i>human Pancoll</i>	Pan Biotech (Aidenbach, D)
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom GmbH (Berlin, D)
Ery-Lyse Puffer pH 7,2	Apotheke des Klinikums der Universität München
Styropor Behälter	-

## 2.1.2 Isolation von Ribonukleinsäure

**Tabelle 5: Geräte für die Isolation von Ribonukleinsäure**

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 417C	Eppendorf (Hamburg, D)
<i>MultiGuard Barrier Tips</i>	Sorenson BioScience, Inc. (Murray, USA)
<i>Primum Tips</i>	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
<i>NanoDrop</i> 1000 Spectrophotometer	Preqlap (Erlangen, D)
<i>NanoDrop</i> 1000 Spectrometer Software	Preqlap (Erlangen, D)
<i>Primum NoFrost</i>	Liebherr (Bulle, CH)
Blockthermostat	HLC Bio Tech (Bovenden, D)
Pipette	Eppendorf (Hamburg, D)
Vasco Niril <i>Blue</i> Handschuhe	Braun (Melsungen, D)
Biosphere Mikroröhre 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
<i>DNA LoBind tube</i> 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Kühlschrank 4°C	Bosch (Stuttgart, D)
Kühlblock	

**Tabelle 6: Materialien für die Isolation von Ribonukleinsäure**

Material	Hersteller
Rotilabo Spritzflasche PE Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
<i>RNase AWAY</i>	Molecular Bio Products (San Diego, USA)
Ethanol	AppliChem (Darmstadt, D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

**Tabelle 7: Inhalt des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen**

<b><i>RNeasy Mini Kit, Quick Start Protocol</i></b>	<b>Qiagen (Hilden, D)</b>
<i>collection tubes 2 ml</i>	
<i>collection tubes 1,5 ml</i>	
<i>RNeasy Mini Spin Column</i>	
Puffer RW1	
Puffer RPE	
Puffer RLT	
<i>RNase-free water</i>	

**Tabelle 8: Inhalt des *RNase-free DNase Sets* von Qiagen**

<b><i>RNase-free DNase Set</i></b>	<b>Qiagen (Hilden, D)</b>
Puffer RDD	
<i>RNase-free water</i>	
<i>DNase I vial</i>	

### 2.1.3 Durchflusszytometrie

Die folgenden Materialien wurden von BioLegend® (San Diego, USA) bezogen:

**Tabelle 9: Antikörper für Durchflusszytometrie von BioLegend**

Produkt	Klon	Menge in Anzahl der enthaltenen Tests (T) oder µg
Alexa Fluor 488 <i>anti-human</i> FoxP3	259D	25T
Alexa Fluor 700 <i>anti-human</i> CD8a	RPA-T8	25 µg
APC <i>anti-human</i> CD197 (CCR7)	G043H7	25T
Brilliant Violet 421 <i>anti-human</i> CD223 (LAG-3)	11C3C65	25T
Brilliant Violet 510 <i>anti-human</i> CD3	UCHT1	25T
Brilliant Violet 605 <i>anti-human</i> CD279 (PD-1)	EH12.2H7	25T
Brilliant Violet 785 <i>anti-human</i> CD62L	DREG-56	25T
PE <i>anti-human</i> CD152 (CTLA-4)	BNI3	25 µg
PE/Cy7 <i>anti-human</i> CD69	FN50	25T
PE/Dazzle 594 <i>anti-human</i> CD366 (TIM-3)	F38-2E2	25T
PerCP/Cy5.5 <i>anti-human</i> CD4	SK3	25T

**Tabelle 10: Materialien für die Durchflusszytometrie**

Material	Hersteller
<i>Fixable Viability Dye</i> eFluor™ 780	eBioscience™ (San Diego, USA)
96 well plate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS) Dulbecco	Biochrom GmbH (Berlin, D)
ddH <sub>2</sub> O	
<i>Fixation/Permeabilization Concentrate</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

<i>Fixation/Permeabilization Diluent</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Permeabilization Buffer (10X)</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

**Tabelle 11: Geräte für die Durchflusszytometrie**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
BD LSRFortessa	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Multifuge X1R	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<i>FlowJo</i> Software	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)

## 2.2 Methoden

Die experimentelle Analyse der Patientenproben erfolgte aus logistischen Gründen in zwei unterschiedlichen Laboren. Zunächst wurden im Labor für Experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung (ELLF) der Medizinischen Klinik III (LMU Klinikum, Campus Großhadern) PBMC und RNA isoliert. Im Verlauf wurde im Labor der Klinischen Pharmakologie der Medizinischen Klinik IV (LMU Klinikum, Campus Innenstadt) die Durchflusszytometrie durchgeführt.

### 2.2.1 Einschlusskriterien

Die Untersuchungen wurden im Rahmen der prospektiven Biomarkerstudie „Der Informative Patient“ durchgeführt. Diese wurde durch die Ethikkommission der LMU München bereits 2010 genehmigt (EK 284-10). Da für das aktuelle Projekt eine zweite Blutentnahme unter Chemotherapie durchgeführt wurde, war eine Aktualisierung des Protokolls sowie der Patienteninformation notwendig. Für dieses Amendment wurde uns von der Ethikkommission der LMU München am 17.03.2016 die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit bescheinigt. Um ein möglichst homogenes Patientenkollektiv zu erhalten, mussten die Patienten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- histologisch gesichertes, duktales Adenokarzinom des Pankreas. Zusätzlich wurde ein Patient mit einem gemischt neuroendokrinen-azinareren Tumor eingeschlossen.
- lokal-fortgeschrittenes oder metastasiertes Tumorstadium
- palliative Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX Schema oder mit Gemcitabin & nab-Paclitaxel.

Ausgeschlossen wurden alle Patienten, die eine begleitende immunmodulatorische Therapie erhielten, sowie Patienten, bei denen während der Therapie ein Infekt aufgetreten war.

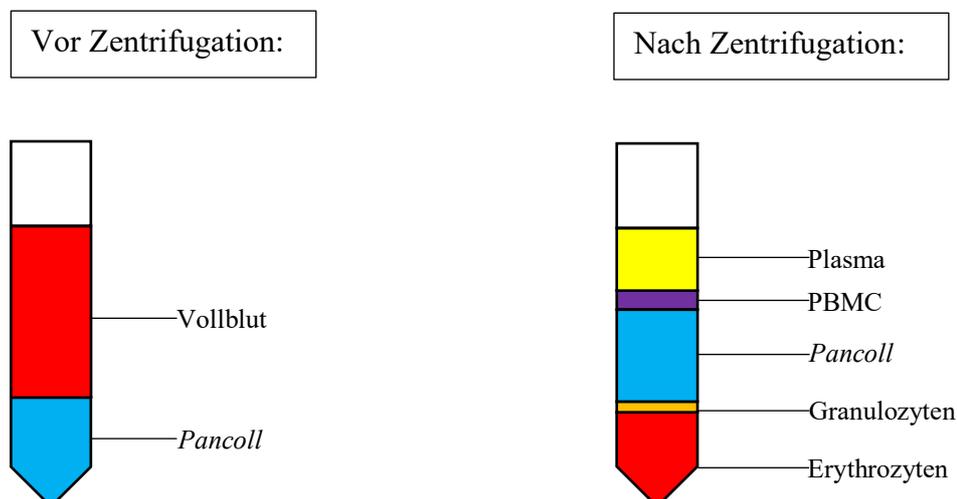
### 2.2.2 Blutentnahmen

Es wurden Blutentnahmen direkt vor Einleitung der Chemotherapie mit FOLFIRINOX oder Gemcitabin & nab-Paclitaxel sowie einen Monat nach Einleitung der Chemotherapie

vorgenommen. Nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten wurden an beiden Terminen jeweils insgesamt 15 ml heparinisiertes Vollblut abgenommen. Dieses wurde entweder direkt zum Labor transportiert oder maximal 3 Stunden bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank aufbewahrt bevor es weiterverarbeitet wurde.

### 2.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripherem Blut, Zellzählung und Kryokonservierung

Diese Methode beruht hauptsächlich auf der Herstellung eines Dichtegradienten, mittels dessen die mononukleären Zellen von den restlichen Blutbestandteilen getrennt werden können. Die Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) erfolgte unter einer sterilen Reinluftwerkbank. Zunächst wurde die Blutprobe im Verhältnis 1:3 mit gekühltem PBS (*Phosphate-buffered saline*) verdünnt. Daraufhin wurden vorsichtig 15 ml *Pancoll* Trennlösung unter das Blut appliziert und die Probe zentrifugiert (Raumtemperatur (15 – 25 °C), 30 Minuten, 900 g, Akzeleration und Dezeleration auf Stufe 1). Das Blut war nun nach Dichtigkeit in Plasma, PBMC, *Pancoll*, Granulozyten und Erythrozyten getrennt und die PBMC Schicht konnte mittels elektrischer Pipette abgesaugt werden.



**Abbildung 2: Darstellung der PBMC-Gewinnung aus Vollblut.** Auf der linken Seite ist der Zustand der Probe nach Applikation von *Pancoll* unter das Vollblut dargestellt. Auf der rechten Seite sieht man die Auftrennung in Plasma, PBMC, *Pancoll*, Granulozyten und Erythrozyten nach Zentrifugation. Die zwischen Plasma und *Pancoll* befindliche PBMC-Schicht kann dann mittels Pipette abgesaugt werden.

Zum Schluss wurden die PBMC zweifach gewaschen, in dem sie in gekühltem PBS suspendiert und anschließend zentrifugiert wurden. Während des gesamten Prozesses wurde darauf geachtet, dass die zwei ursprünglichen Blutproben getrennt gehalten wurden, um eine Probe für die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) verwenden zu können. Waren im Zellpellet nach der ersten Zentrifugation makroskopisch Erythrozyten erkennbar, war die Indikation für eine Ery-Lyse gegeben. Hierfür wurde zunächst 5 ml Lysepuffer auf das Zellpellet gegeben und daraufhin die Probe für 5 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde die Probe mit PBS bis unter den Rand des *tubes* aufgefüllt und die PBMC abzentrifugiert. Danach wurde wie gewohnt mit dem Protokoll weiterverfahren.

#### **2.2.4 Zellzählung**

Bei den ersten sieben Proben wurde aus einem der zwei Röhrchen die Zellzahl bestimmt. Die Zellzählung wurde am Vi-CELL™ XR von Beckman-Coulter durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das entstandene Zellpellet in 10 ml PBS gelöst. Von dieser Lösung wurden 250 µl abgezogen und mit 250 µl PBS aufgefüllt. Die entstandenen 500 µl wurden zur Zellzählung verwendet. Das Prinzip des Geräts beruht auf einer Färbung der Zellen mittels Trypanblau und der anschließenden Auszählung der Zellen mittels digitaler Bildtechnologie. Nach mehreren Zellzählungen zeigte sich, dass die Zellzahl keine kritische Menge überschritt, die eine deutliche Anpassung der Reagenzien im ersten Schritt der RNA Isolation notwendig gemacht hätte. Daher konnte die Zellzählung in den folgenden Proben unterlassen werden. Dies diente insbesondere dem Erhalt der Zellen, da durch den Prozess des wiederholten Waschens und Zentrifugierens bei der Zellzählung Zellen verloren gehen.

#### **2.2.5 Kryokonservierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut**

Zum Einfrieren der PBMC wurde eine Mischung aus neun Teilen FBS (Fötales Bovines Serum) und einem Teil DMSO (Dimethylsulfoxid) vorbereitet. Das Zellpellet wurde in 1 ml des FBS/DMSO Gemischs aufgelöst und bei – 80 °C eingefroren. Nach wenigen Wochen wurden die PBMC in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

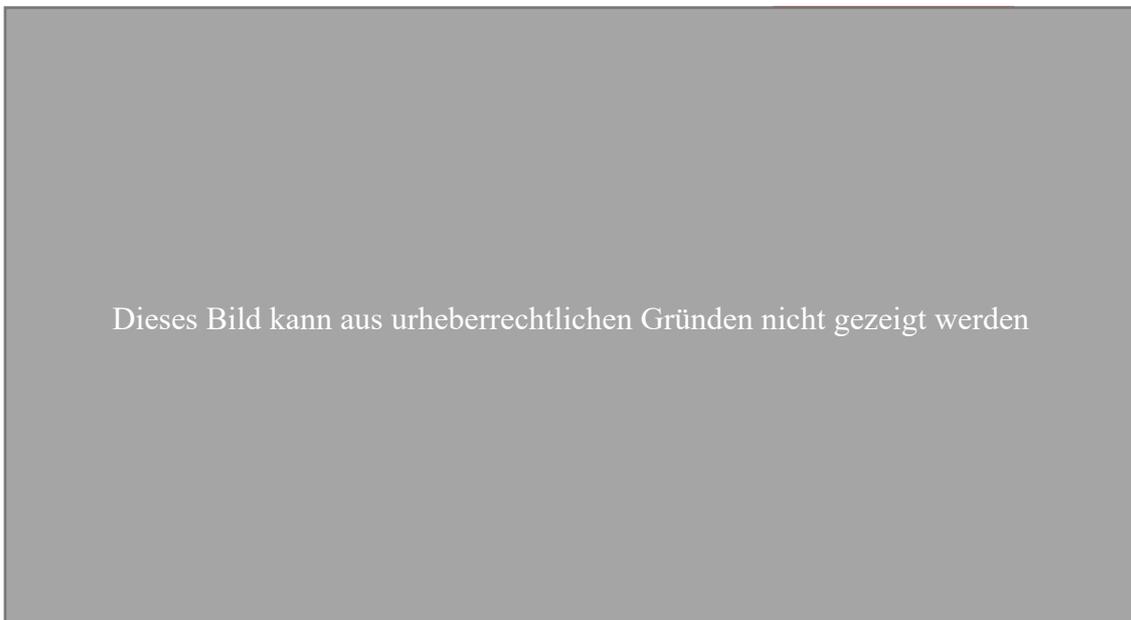
### 2.2.6 Isolation der Ribonukleinsäure mit dem *RNeasy Mini Kit, Quick-Start Protocol* von Qiagen

Die RNA Isolation erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit, Quick Start Protocol* von Qiagen und dem *RNase free DNase Set* von Qiagen. Die Protokolle der Hersteller wurden, falls nötig, angepasst.

Das Zellpellet aus dem zweiten Röhrchen der PBMC Isolation wurde unter S1 (Schutzstufe 1 gemäß Gentechnikgesetz) Bedingungen weiterverarbeitet. Zuerst wurden alle Oberflächen und verwendete Geräte mit Ethanol und *RNase Away Spray* dekontaminiert. Daraufhin wurde ein Gemisch aus 10 µl β-Mercaptoethanol und RLT Puffer hergestellt. Danach konnte durch Zugabe dieses Gemisches sowie Ethanol ein Lysat hergestellt werden, welches auf eine *spin column* gegeben und zentrifugiert (15 sec  $\geq 8000 \times g$ ) wurde. Danach wurde die optionale *on-column DNase digestion* mit dem *RNase-free DNase Set* vorgenommen. Diese erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde zunächst RW1 Puffer auf die Membran gegeben und zentrifugiert (30 sec  $\geq 8000 \times g$ ), dann RPE Puffer und wieder zentrifugiert (30 sec  $\geq 8000 \times g$ ). Die Zugabe von RPE Puffer wurde wiederholt und 2 min bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Dann wurde die Membran in ein neues *collection tube* gegeben und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Währenddessen wurde 60 µl *RNase* freies Wasser auf 58 °C erhitzt, wovon 30 µl auf die Membran gegeben, für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (1 min  $\geq 8000 \times g$ ) wurde. Diese Schritte wurden nochmals wiederholt. Am Ende entstanden so 60 µl mit RNA angereichertes Wasser. Dieses wurde umgehend gekühlt und der RNA Gehalt mittels *NanoDrop* Spektralphotometer gemessen. Zu diesem Zweck wurden 1 bis 2 µl des mit RNA angereicherten Wassers auf das Spektralphotometer gegeben und mittels CCD (*Charge-coupled device*) Sensor gemessen. Dabei wird die Absorption der Moleküle bei bestimmten Wellenlängen untersucht. Nukleotide wie RNA, ssDNA (*single-stranded deoxyribonucleic acid*) und dsDNA (*double-stranded DNA*) haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, weshalb eine sorgfältige Aufreinigung der Probe im Vorfeld von Nöten ist (Spectrophotometers). Um die Reinheit der RNA Probe zu bestimmen, wird das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm (260/280 Ratio) bestimmt, welcher bei reiner RNA bei ~2,0 liegen sollte

(Spectrophotometers). Wenn die Ratio deutlich darunter liegt, kann von einer Verunreinigung durch andere Stoffe ausgegangen werden (Spectrophotometers).

Falls aufgrund einer geringen RNA Menge nötig, wurde die Membran aus der RNA Isolation nochmals mit weiteren 30  $\mu\text{l}$  *RNase* freiem Wasser ausgewaschen, wodurch am Ende 90  $\mu\text{l}$  mit RNA angereichertes Wasser entstand. Nach der Messung wurde die restliche RNA-haltige Flüssigkeit in ein Kryogefäß überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach wenigen Wochen wurde die gefrorene RNA ebenfalls in Stickstoff überführt.



**Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Bestimmung der Reinheit Nukleotidsäuren mittels NanoDrop Software. Unterschiedliche Nukleotidsäuren zeigen charakteristische Kurvenverläufe (Im Bild wird exemplarisch dsDNA gemessen).**

Abbildung modifiziert aus (Spectrophotometers)

## 2.2.7 Durchflusszytometrie

### 2.2.7.1 Allgemeines Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beruht einerseits auf der Messung der Streuung von Licht durch die Zellen selbst und andererseits auf der Fluoreszenz von Antikörpern, mit denen die Zellen markiert wurden. Zunächst werden die Zellen in einer Suspension von dem Gerät aufgenommen. Innerhalb einer Flusskammer werden die Zellen zunächst von einem Vorwärtstreulicht, welches vorrangig die Größe der Zelle detektiert, getroffen.

Zudem werden sie von einem Seitwärtsstreulicht, welches die Granularität der Zellen bestimmt, erfasst. Für eine genauere Unterscheidung erfolgt im Vorfeld eine Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern, die beispielsweise gegen CD (*Cluster of differentiation*) Oberflächenmoleküle gerichtet sein können. Der Laserstrahl regt die Antikörper zur Emission von Photonen an, die durch eine Linse gesammelt werden. Mittels verschiedener Filter erfolgt die Auftrennung des Lichts, sodass die Detektoren die Signale aufnehmen und in einer Mehrfarbenanalyse quantitativ auswerten können. Da es zu Überschneidungen der unterschiedlichen fluoreszierenden Signale kommt, muss vor der eigentlichen Analyse der Proben eine sogenannte Kompensation durchgeführt werden. Hierzu werden Kontrollproben hergestellt, die jeweils nur mit einem bestimmten Antikörper-Fluorochrom-Komplex gefärbt sind. Damit kann sichtbar gemacht werden, wie stark ein bestimmtes Fluoreszenzsignal in die anderen Kanäle hineinstrahlt. Daraus ergibt sich der Anteil von jedem registrierten Fluoreszenzsignal, der sich mit anderen Signalen überschneidet und daher abgezogen werden muss. Zusätzlich kann das Signal der einzelnen Kanäle so verändert werden, dass sich Zellen stärker bezüglich ihrer Eigenschaften unterscheiden. Nach der erfolgreichen Kompensation erfolgt die eigentliche Färbung der Zellen und die Analyse am Durchflusszytometer.

### **2.2.7.2 Ablauf der Durchflusszytometrie**

Die intra- und extrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie erfolgte mittels eines Protokolls aus dem Labor für Klinische Pharmakologie der LMU München. Zuerst wurden die gefrorenen Zellen aufgetaut, auf eine 96-well Platte aufgetragen und abzentrifugiert (5 min 400 x g). Daraufhin wurde ein sog. *mastermix* aus 10 µl *Phosphate-buffered saline* (PBS), 1,5 µl von jedem extrazellulären FACS Antikörpern (AK) und 0,1 µl *Fixable Viability Dye* eFluor pro well erstellt. Als extrazelluläre Färbung wurden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD62L, CCR7, CD69, PD-1, LAG-3, CTLA-4 (extrazelluläre Färbung) und TIM-3 verwendet. Pro well wurden dann 40 µl PBS vorgelegt und 10 µl des *mastermix* hinzugegeben. Daraufhin wurde die Platte für 30 Minuten unter Lichtausschluss bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 400 x g, 20 °C, Acceleration und Deceleration Stufe 1) wurde 100 µl Fixationslösung (25 ml Konzentrat und 75 µl *diluent* pro well) pro well hinzugeben und wieder für 30 Minuten unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert und danach zentrifugiert. Währenddessen wurden 450 µl Puffer pro well aus *Wash-Puffer X10* und zweifach destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:10 hergestellt. Die wells wurden

jeweils mit 100 µl dieses Puffers gewaschen und wiederrum zentrifugiert. Danach folgte die intrazelluläre Färbung (intrazelluläres CTLA-4 und FoxP3). Hierfür wurde ein *mastermix* aus 1,5 µl intrazellulärem Antikörperlösung und Pufferlösung hergestellt. Daraufhin wurden 40 µl Puffer und 10 µl *mastermix* pro *well* hinzugegeben und die Platte nach 30-minütiger Inkubation im Kühlschrank zweifach mit 150 µl Puffer gewaschen. Jeder der oben aufgeführten Schritte wurde auch parallel ohne FACS-Antikörper an einem Teil der Zellen durchgeführt, um ungefärbte Kontrollen für die spätere Auswertung zu erhalten. Zuletzt wurde pro *well* ein Tropfen *counting beads* zugegeben und die Proben im Anschluss am BD LSRFortessa analysiert. Zur Auswertung der Durchflusszytometrie wurde die *Flow Jo Software* von BD Biosciences verwendet.

### **2.2.8 Auswertung der Ergebnisse**

Zur statistischen Analyse und für die graphische Darstellung wurde mit Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA) und SPSS (IBM Corp., NY, USA) gearbeitet. Die Überlebenskurven wurden mittels der Kaplan-Meier Überlebensanalyse erstellt. Ein statistischer Vergleich der Kurven erfolgte mittels Log-rank Test und Gehan-Breslow-Wilcoxon Test (GBW Test). Die Hazard Ratio (HR) wurde durch das Cox Regressionsmodell mittels uni- und multivarianter Analyse bestimmt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

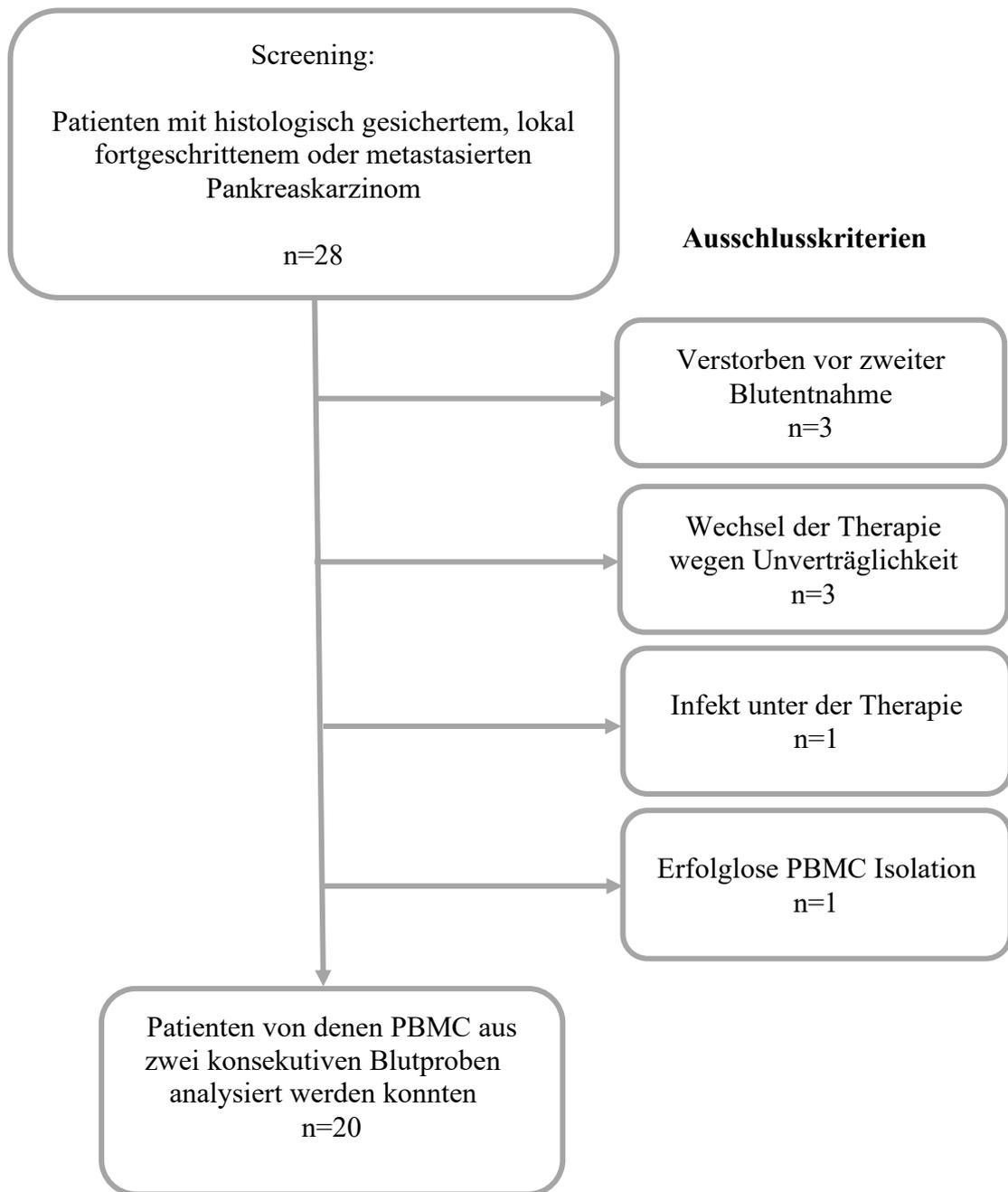
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patientenpopulation

#### 3.1.1 Klinische Daten

Im Zeitraum von April 2016 bis Oktober 2017 wurden insgesamt 28 konsekutive Patienten eingeschlossen. Im Verlauf mussten drei Patienten ausgeschlossen werden, da sie aufgrund von Unverträglichkeiten frühzeitig das Therapieregime wechselten, sowie ein Patient, der während der Therapie einen schweren systemischen Infekt entwickelte. Zudem konnten drei weitere Patienten nicht weiterverfolgt werden, da sie noch vor der zweiten Blutabnahme verstarben. In einem Fall war die Isolation der PBMC technisch nicht erfolgreich. Insgesamt lagen somit vollständige Daten von 20 Patienten vor. Zwei dieser Patienten zeigten bis Abschluss der Studie im Dezember 2019 keine Krankheitsprogredienz, weshalb ihre Daten zum progressionsfreien Überleben (*Progressionfree survival*, PFS) und Gesamtüberleben (*Overall survival*, OS) zensiert wurden. Bei einem Patienten lagen nach Juni 2016 keine weiteren Daten vor, weshalb sein PFS und OS ebenfalls zensiert wurde.

Nach Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien, der erfolgreichen Isolation der PBMC sowie der Durchflusszytometrie (vgl. Abb. 4) konnten 20 Patienten eingeschlossen werden. Die Patienten wurden von April 2016 bis Oktober 2017 eingeschlossen und bis Oktober 2019 nachverfolgt.



**Abbildung 4: Darstellung der Einschluss- und Ausschlusskriterien.**

Nach ursprünglicher Auswahl von 28 Patienten konnten unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien die konsekutiven Blutproben von 21 Patienten in die Analyse mit einbezogen werden. Nachdem die Isolation von PBMC aus einer Probe nicht erfolgreich war, konnten insgesamt 20 Patienten in die Analyse aufgenommen werden.

**Tabelle 12: Darstellung der Verteilung klinischer Parameter im untersuchten Patientenkollektiv**

<b>Parameter</b>		<b>Median oder n (% oder Range)</b>
<b>Alter</b>		61 (46-78)
<b>Geschlecht</b>	männlich	13 (65%)
	weiblich	7 (35%)
<b>Stadien nach UICC</b>	I	0 (0%)
	II	0 (0%)
	III	2 (10%)
	IV	18 (90%)
<b>ECOG</b>	1	19 (95%)
	2	0 (0%)
	3	1 (5%)
<b>Lokalisation der Fernmetastasen</b>	Leber	10 (50%)
	Andere Lokalisation	3 (15%)
	Leber und andere Lokalisation	1 (5%)
<b>Metastasierung</b>	synchron	9 (45%)
	metachron	5 (25%)
<b>Histologie des Karzinoms</b>	Adenokarzinom	19 (95%)
	gemischt neuroendokrino-azitär	1 (5%)
<b>Chemotherapie</b>	FOLFIRINOX	17 (85%)
	Gem & nab-Pac	3 (15%)

*UICC: Union for International Cancer Control*

*ECOG: Performance-Status gemäß der Eastern Cooperative Oncology Group*

*n: Anzahl*

**Tabelle 13: Klinische Parameter der eingeschlossenen Patienten.**

ID	Alter*	m/w	CA19-9 [U/ml]	CEA [ng/ml]	Therapie bei Einschluss
2	47	m	183	2,3	FOLFIRINOX
3	74	w	101	1,2	FOLFIRINOX
4	52	w	1660	6,3	FOLFIRINOX
5	72	m	643	7,6	FOLFIRINOX
6	55	m	318	5,1	FOLFIRINOX
7	76	m	<2,6	282	FOLFIRINOX
9	66	m	916	2,1	FOLFIRINOX
11	57	m	855	-	FOLFIRINOX
13	78	m	7	10,4	Gemcitabin & nab-Paclitaxel
14	55	m	8,6	2,9	FOLFIRINOX
15	55	m	614	9,8	FOLFIRINOX
16	60	w	283	2,0	FOLFIRINOX
17	52	m	524	47,3	FOLFIRINOX
18	70	w	371	12,7	Gemcitabin & nab-Paclitaxel
20	68	m	1028	4,6	Gemcitabin & nab-Paclitaxel
21	71	w	140	2,2	FOLFIRINOX
22	65	m	107	3,8	FOLFIRINOX
26	55	w	452	22,3	FOLFIRINOX
27	62	w	1435	-	FOLFIRINOX
28	46	m	>10000	6,1	FOLFIRINOX

\*Bei Therapiebeginn

m/w: männlich/weiblich

ID: Identifikationsnummer

Das mediane Alter der eingeschlossenen Patienten lag bei 61 Jahren (Range 46-78 Jahre). Bei 14 von 20 Patienten (70%) lagen bei Therapiebeginn bereits Fernmetastasen vor (die genaue Lokation ist der Tabelle 12 zu entnehmen). Der *Performance*-Status gemäß der *Eastern Cooperative Oncology Group* (EGOC) der meisten Patienten war insgesamt sehr gut mit einem Wert von 0-1, nur ein Patient wies einen ECOG von 3 auf. Die Mehrheit der Patienten (n=17, 85%) erhielt eine Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX Schema, lediglich drei Patienten (15%) erhielten Gemcitabin & nab-Paclitaxel. Zu Therapiebeginn wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Tumormarker CA 19-9 (*Carbohydrate antigen 19-9*) und CEA (*Carcinoembryonales Antigen*) abgenommen und im Verlauf regelmäßig kontrolliert.

### 3.1.2 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben

Das progressionsfreie Überleben (*Progression-free survival*, PFS) wurde definiert als der Zeitpunkt zwischen der ersten Blutabnahme (die auch dem Beginn der Therapie entspricht) und dem Nachweis einer Krankheitsprogression in einer Schnittbildgebung (Computer- oder Magnetresonanztomographie) gemäß den RECIST-Kriterien (*Response evaluation criteria in solid tumors*) (Eisenhauer 2009).

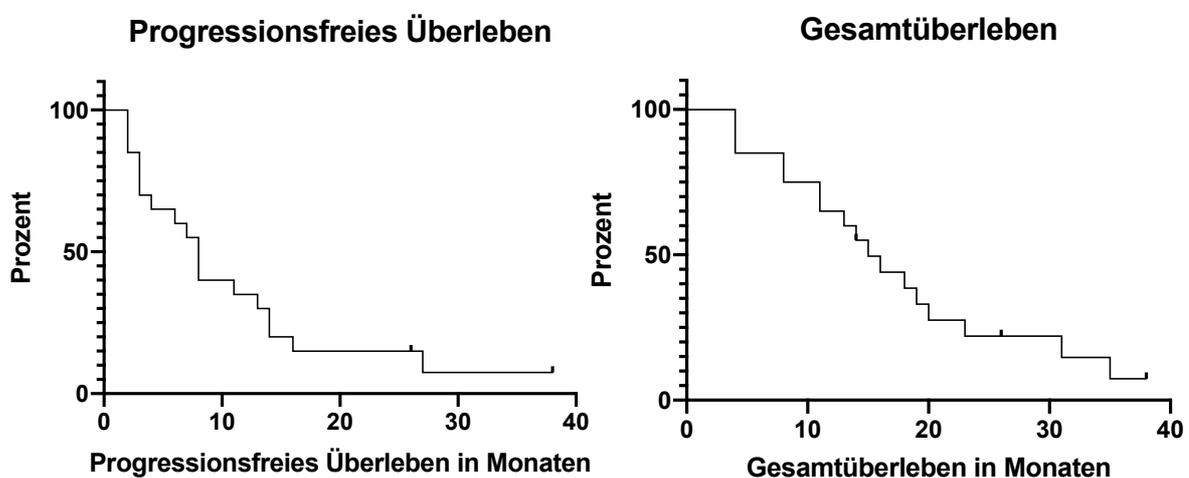
**Tabelle 12: Übersicht des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens der einzelnen Patienten**

<b>Patientennummer</b>	<b>Progressionsfreies Überleben [Monate]</b>	<b>Gesamtüberleben [Monate]</b>
2	8	11
3	14	20
4	27	35
5	7	8
6	14	19
7	16	31
9	38*	38*
11	3	18
13	2	4
14	8	23
15	2	4
16	3	13
17	2	14*
18	6	15
20	8	14
21	3	8
22	11	11
26	26*	26*
27	13	16
28	4	4

\* Daten zensiert

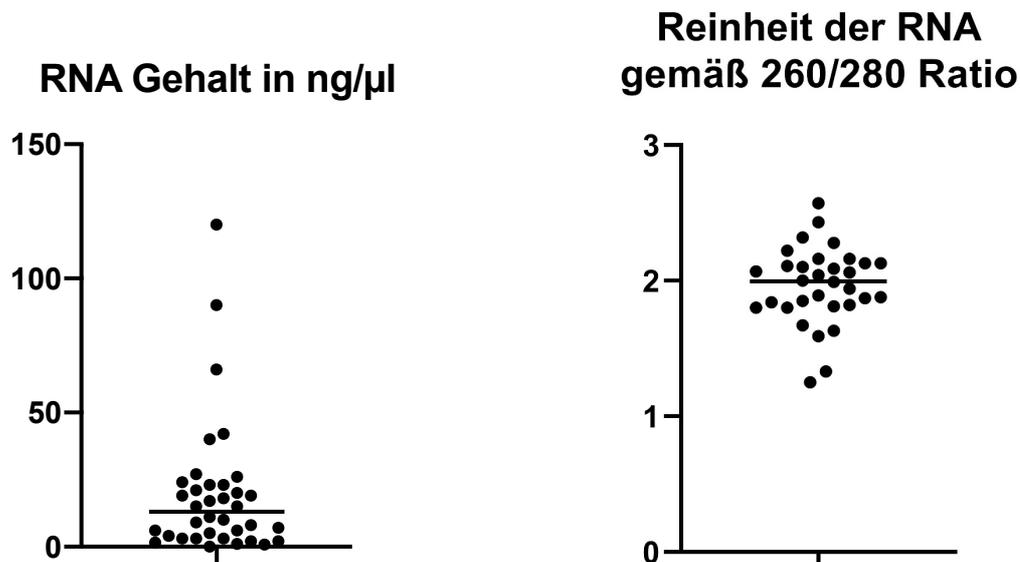
Bei einer Gruppierung der OS Daten nach Chemotherapie-Regimen ergibt sich für Patienten, die Gemcitabin & nab-Paclitaxel erhielten ein medianes progressionsfreies Überleben von 6 Monaten und in der FOLFIRINOX Gruppe ein PFS von 8 Monaten. Das mediane progressionsfreie Überleben der Gesamtgruppe lag bei 8 Monaten.

Das Gesamtüberleben (*Overall survival, OS*) wurde definiert als der Zeitpunkt zwischen der ersten Blutabnahme und dem Tod des Patienten. Für Patienten, die Gemcitabin & nab-Paclitaxel erhielten ergab sich ein medianes Gesamtüberleben von 14 Monaten. In der FOLFIRINOX Gruppe lag dieses bei 15 Monaten. Das mediane Gesamtüberleben der gesamten Patientengruppe lag bei 15 Monaten.



**Abbildung 5: Darstellung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens des gesamten Patientenkollektivs**

### 3.2 Ergebnisse der Isolation von Ribonukleinsäure

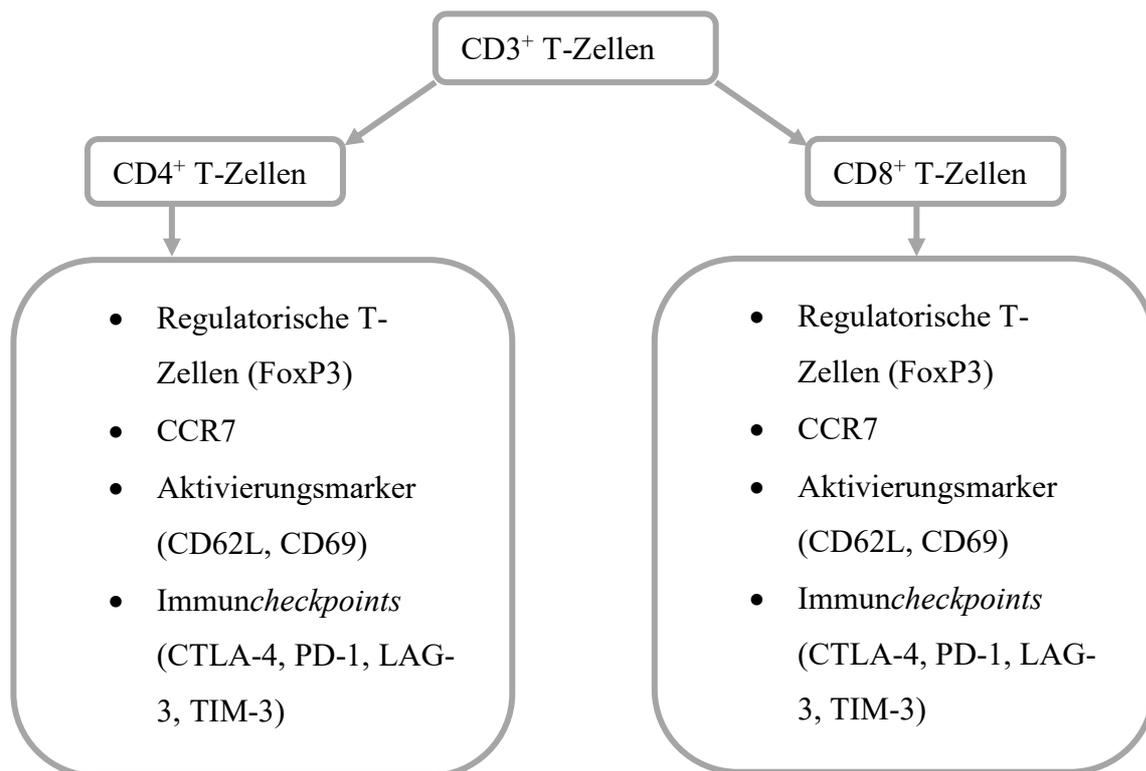


**Abbildung 6: Darstellung der Menge und Reinheit der RNA, die aus den PBMC gewonnen wurde.** Links ist die isolierte RNA Menge in ng/µl angegeben sowie der Median dargestellt. Auf der rechten Seite ist die Reinheit der RNA als Absorptionsratio dargestellt. Eine Ratio von 2,0 entspricht dabei reiner RNA. Eine Ratio von kleiner oder größer 2 lässt Rückschlüsse auf eine Verunreinigung mit Phenolen, Proteinen oder anderen Stoffen zu. Zudem ist in der Abbildung ebenfalls der Median der 260/280 Absorptionsratio veranschaulicht.

Die Isolation der RNA wurde bis zum 23. Patienten durchgeführt und war bis auf eine Probe (Patienten ID16, Probe Nr.1) erfolgreich. Es ergab sich im Median eine Menge von 13 ng/µl mit einigen wenigen Proben, die deutliche mehr RNA ergaben (siehe Abb. 6, linke Seite). Insgesamt wurden in der Regel 60 µl, selten 90 µl mit RNA angereichertes Wasser hergestellt. Die Reinheit der RNA wurde mittels 260/280 Ratio bemessen und lag im Median bei 1,99 (vergleiche Abbildung 6). Dies lässt auf eine hohe Reinheit schließen (Spectrophotometers).

### 3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Eine erfolgreiche Durchflusszytometrie konnte an 20 Patientenproben durchgeführt werden. Bei jeweils zwei Proben pro Patienten ergaben sich somit insgesamt 40 untersuchte Proben. Die aus der PBMC Isolation gewonnenen Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CCR7, CD62L, CD69, CTLA-4, FoxP3, LAG-3, PD-1 und TIM-3 gefärbt.



**Abbildung 7: Methodik der Auswertung der Durchflusszytometrie.** Ausgehend von CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Auf diesen wurden jeweils die Expression verschiedener T-Zellmarker untersucht.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels *FlowJo* Software. Dabei wurde zunächst die Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt und von diesen ausgehend die Zahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Jeweils auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde daraufhin die Expression der T-Zellmarker untersucht (vgl. Abb. 7).

### 3.3.1 Berechnung und Übersicht der Expression von T-Zellmarkern

Zunächst sollte die Expression der Marker veranschaulicht werden. Dazu wurde der Anteil an T-Zellen, die einen Marker exprimierten, ermittelt und in Bezug zu der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Somit konnte die Vergleichbarkeit unter den Gruppen erhöht und Schwankungen in den Zellzahlen ausgeglichen werden. Dazu wurde folgende Kalkulation verwendet:

#### Berechnung der Expression:

$$\frac{\text{CD4 oder CD8 positive Zellen}}{\text{Zellzahl CD3}} \times 100 = \text{Expression 1 CD4 o. CD8 in Prozent}$$

$$\frac{\text{Markerpositive Zellen}}{\text{Zellzahl CD4 oder CD8}} \times 100 = \text{Expression 1 des Markers in Prozent}$$

#### Berechnung der Veränderung zwischen Zeitpunkt 1 (vor Chemotherapie) und Zeitpunkt 2 (unter Chemotherapie):

$$\begin{aligned} & \text{Expression Zeitpunkt 2} - \text{Expression Zeitpunkt 1} \\ & = \text{Veränderung der Expression in Prozent} \end{aligned}$$

Die Analyse der PBMC ergab im Median 133 x 10<sup>3</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu Therapiebeginn und 202 x 10<sup>3</sup> nach 30 Tagen. Ebenfalls veränderte sich die Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie deren Expression in Prozent auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Auffallend ist hierbei die Veränderung im Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 56% zu Therapiebeginn auf 66% nach 30 Tagen (vgl. Tab. 13).

**Tabelle 13: Zellzahl und Expression von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

	<b>Zellzahl* zu Therapiebeginn in n x 10<sup>3</sup></b>	<b>Anteil CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> an CD3<sup>+</sup> Therapiebeginn</b>	<b>Zellzahl* nach 30 Tagen in n x 10<sup>3</sup></b>	<b>Anteil CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> an CD3<sup>+</sup> nach 30 Tagen</b>
<b>CD3<sup>+</sup></b>	133		202	
<b>CD4<sup>+</sup></b>	78	56 %	132	66%
<b>CD8<sup>+</sup></b>	28	24 %	37	26%

\* Angaben im Median

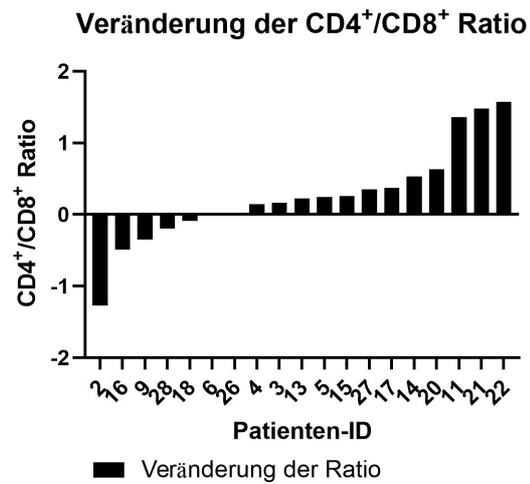
**Tabelle 14: Veränderung in der Expression verschiedener T-Zellmarker.**

Darstellung der Anzahl sowie des Prozentsatzes an Patienten, die eine Zu- bzw. Abnahme oder keine Veränderung der Expression eines bestimmten Markers zeigten

<b>T- Zellmarker</b>	<b>Zunahme n (%)</b>	<b>Abnahme oder keine Veränderung n (%)</b>
<b>CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup></b>	12 (60%)	8 (40%)
<b>CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	5 (25%)	15 (75%)
<b>CD4<sup>+</sup>/CCR7</b>	10 (50%)	10 (50%)
<b>CD4<sup>+</sup>/CD62L</b>	9 (45%)	11 (55%)
<b>CD4<sup>+</sup>/CD69</b>	9 (45%)	11 (55%)
<b>CD4<sup>+</sup>/CTLA-4</b>	10 (50%)	10 (50%)
<b>CD4<sup>+</sup>/FoxP3</b>	6 (30%)	14 (70%)
<b>CD4<sup>+</sup>/LAG-3</b>	3 (15%)	17 (85%)
<b>CD4<sup>+</sup>/PD-1</b>	8 (40%)	12 (60%)
<b>CD4<sup>+</sup>/TIM-3</b>	10 (50%)	10 (50%)
<b>CD8<sup>+</sup>/CCR7</b>	7 (35%)	13 (65%)
<b>CD8<sup>+</sup>/CD62L</b>	12 (60%)	8 (40%)
<b>CD8<sup>+</sup>/CD69</b>	12 (60%)	8 (40%)
<b>CD8<sup>+</sup>/CTLA-4</b>	13 (65%)	7 (35%)
<b>CD8<sup>+</sup>/FoxP3</b>	8 (40%)	12 (60%)
<b>CD8<sup>+</sup>/LAG-3</b>	6 (30%)	14 (70%)
<b>CD8<sup>+</sup>/PD-1</b>	8 (40%)	12 (60%)
<b>CD8<sup>+</sup>/TIM-3</b>	9 (45%)	11 (55%)

Tabelle 14 stellte die Veränderung in der Expression eines Markers dar. Zumeist zeigte circa die Hälfte der Patienten eine Zu- beziehungsweise Abnahme der Expression. Ausnahmen sind unter anderem CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/FoxP3, CD4<sup>+</sup>/LAG-3 sowie CD8<sup>+</sup>/LAG-3. Um die Veränderung in der Expression von CD4 und CD8 auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Expression der T-Zellmarker auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen darzustellen, wurden zur weiteren Veranschaulichung Wasserfalldiagramme erstellt (vgl. Tabelle 16). Diese zeigen für jeden Patienten die Veränderung in Prozent, gemäß der zuvor beschriebenen Formel, an. Somit kann für jeden einzelnen Patienten die Expressionsänderung unter Therapie beurteilt werden. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden. Für eine bessere Übersicht wird im Folgenden zwischen CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio, FoxP3 als Marker für regulatorische T-Zellen, CCR7, T-Zell Aktivierungsmarkern sowie *Immunecheckpoints* unterschieden.

### 3.3.2 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio

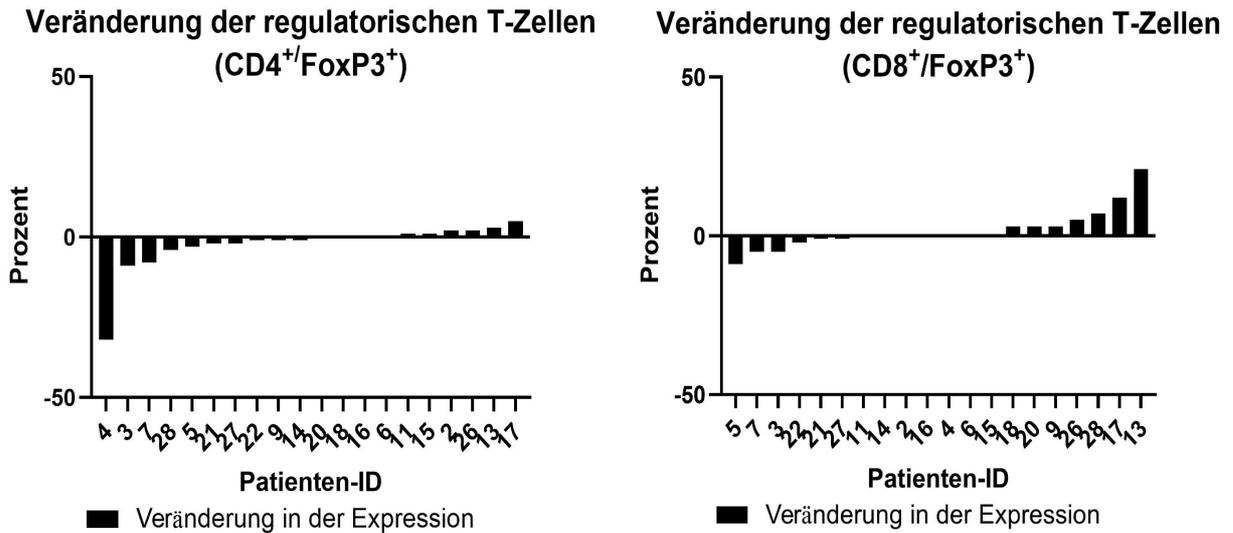


**Abbildung 8: Darstellung der Veränderung der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio**

*Patienten-ID: Identifikationsnummer*

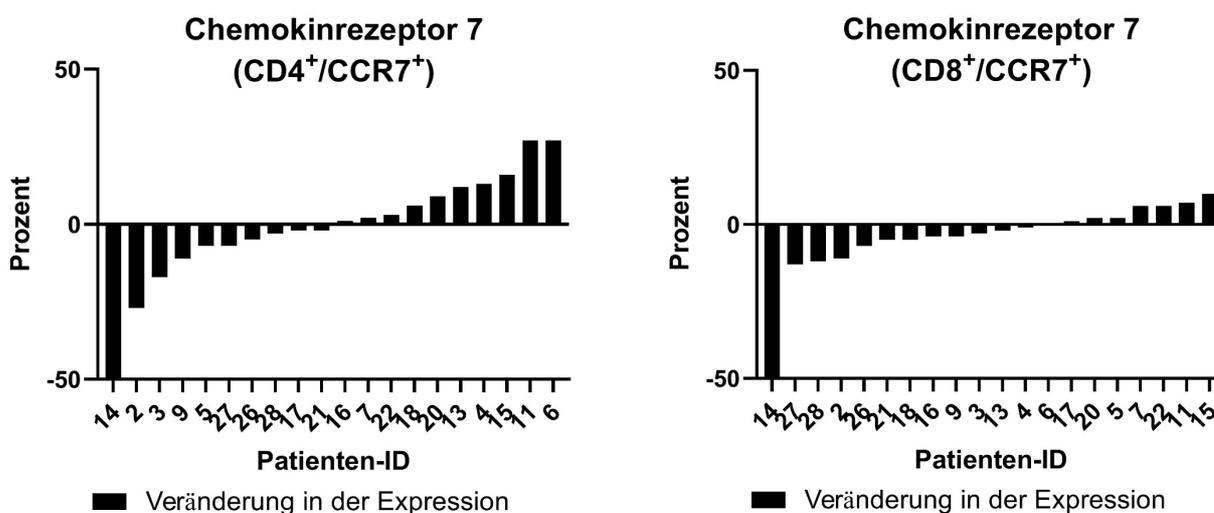
Die Untersuchung ergab, dass die meisten Patienten (n=12, 65%) im Verlauf eine Zunahme der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio zeigten. Dies bedeutet eine Verschiebung der Ratio hin zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.3.3 Regulatorische T-Zellen



### 3.3.4 Chemokinrezeptor 7

Der Chemokinrezeptor CCR7 spielt eine wichtige Rolle für die T-Zell-Migration Richtung Lymphknoten. Dort kommt es zu einer antigenspezifischen Aktivierung der T-Zellen. Insgesamt kam es bei CCR7 im Laufe der ersten 30 Tage bei vielen Patienten zu deutlichen Veränderungen (vgl. Abb. 10). Insbesondere Patient 14 zeigte eine deutliche Abnahme der CCR7 Expression sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (vgl. Abb. 10).



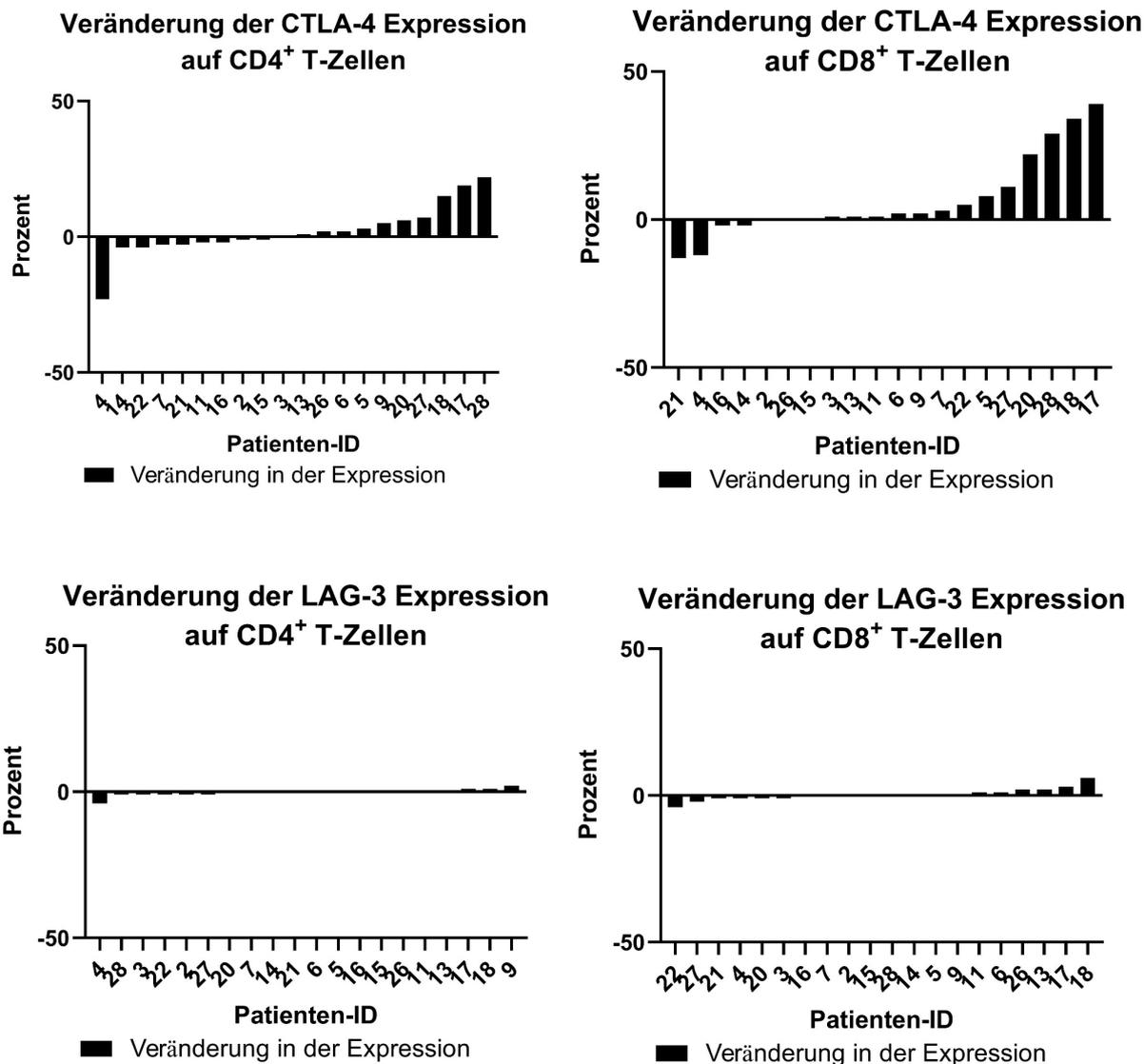
**Abbildung 10: Darstellung der Veränderung des Expression des Chemokinrezeptors 7 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

*Patienten-ID: Identifikationsnummer*



### 3.3.6 Immuncheckpoints

Im Folgenden soll auf die Immuncheckpoints CTLA-4, LAG-3, PD-1 und TIM-3 eingegangen werden.

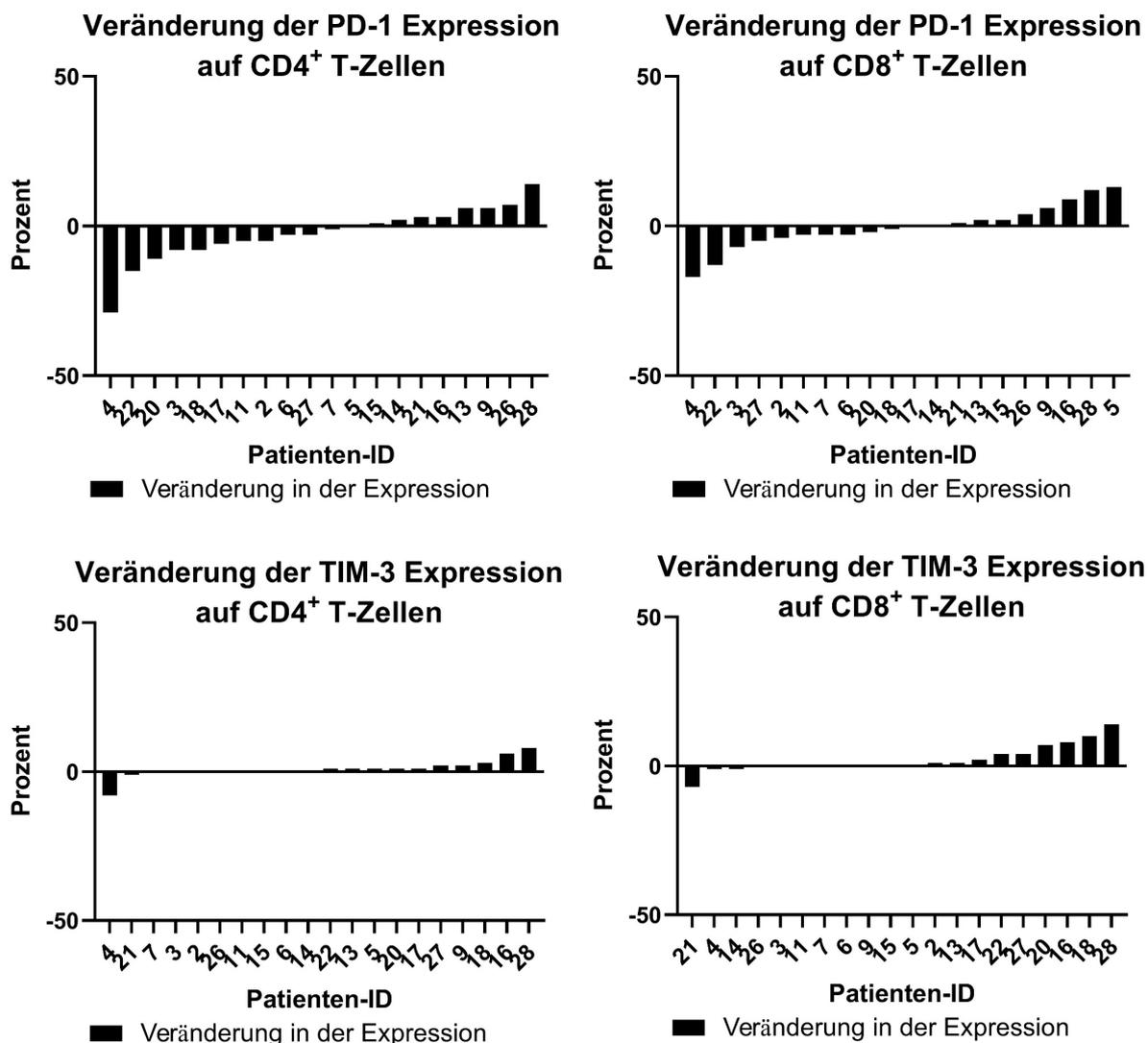


**Abbildung 12: Darstellung der Expression von CTLA-4 und LAG-3 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.**

*Patienten-ID: Identifikationsnummer*

Die Expression von CTLA-4 variierte teils deutlich zwischen der Abnahme vor Therapiebeginn und während der Therapie. Insbesondere die Zunahmen der Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen war teilweise stark ausgeprägt (vgl. Abb. 12). Bei der Betrachtung von LAG-3 fällt auf, dass sich die Expression meist nicht deutlich oder gar nicht

veränderte, sondern häufig lediglich im einstelligen Prozentbereich variierte (vgl. Abb.12).



**Abbildung 13: Darstellung der Expression von PD-1 und TIM-3 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.**

Die Veränderung der Expression von PD-1 war sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen teils sehr ausgeprägt. Patient 4 und 22 zeigten beispielsweise sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine deutliche Abnahme der PD-1 Expression im Verlauf der Therapie (vgl. Abb. 13). Für die Expression von TIM-3 war nur bei wenigen Patienten eine Abnahme nachweisbar, in der Mehrzahl der Patienten war eine unveränderte oder gering zunehmende Expression nachweisbar (vgl. Abb. 13).

### 3.4 Klinische Prognosefaktoren

Zunächst stellte sich die Frage, ob in unserer Kohorte klinischen Parameter mit dem progressionsfreien Überleben (*Progressionfree survival*, PFS, Tabelle 15) oder dem Gesamtüberleben (*Overall survival*, OS, Tabelle 16) der Patienten korrelieren. Zu diesem Zweck wurde eine Cox Regressionsanalyse durchgeführt. In diese Analyse wurde das Alter der Patienten bei Erstdiagnose, Geschlecht, CA 19-9- und der CEA Wert bei Beginn der Chemotherapie, Tumorstadium (lokal-fortgeschritten versus metastasiert bei Einschluss) und das verwendete Chemotherapieregime einbezogen. Wie an der *Hazard Ratio* (HR) und dem p-Werts abzulesen, war für die genannten Faktoren keine statistisch signifikante Korrelation in unserem Kollektiv nachzuweisen.

**Tabelle 15: Darstellung des Einflusses klinischer Größen auf das progressionsfreie Überleben (PFS)**

Variable			95% Konfidenzintervall für HR*	
	p-Wert	HR*	unteres	oberes
<b>Alter</b>	0,999	1,000	0,950	1,052
<b>Geschlecht</b>	0,464	1,447	0,538	3,893
<b>CA 19-9</b>	0,587	1,000	0,999	1,001
<b>CEA</b>	0,675	0,998	0,991	1,006
<b>Metastasierung bei Einschluss</b>	0,890	0,932	0,347	2,503
<b>Chemotherapie: FOLFIRINOX vs. Gem/nab Pac</b>	0,185	0,411	0,110	1,529

\**Hazard Ratio*

**Tabelle 16: Darstellung des Einflusses klinischer Größen auf das Gesamtüberleben (OS)**

Variable			95% Konfidenzintervall für HR*	
	p-Wert	HR*	unteres	oberes
<b>Alter</b>	0,704	1,010	0,958	1,066
<b>Geschlecht</b>	0,610	1,297	0,477	3,527
<b>CA 19-9</b>	0,654	1,000	0,999	1,001
<b>CEA</b>	0,528	0,997	0,990	1,005
<b>Metastasiert bei Einschluss</b>	0,555	0,738	0,270	2,019
<b>Chemotherapie: FOLFIRINOX vs. Gem nab Pac</b>	0,150	0,370	0,095	1,435

\**Hazard Ratio*

### **3.5 Korrelation von Prognose und dynamischer Expression der untersuchten T-Zellmarker**

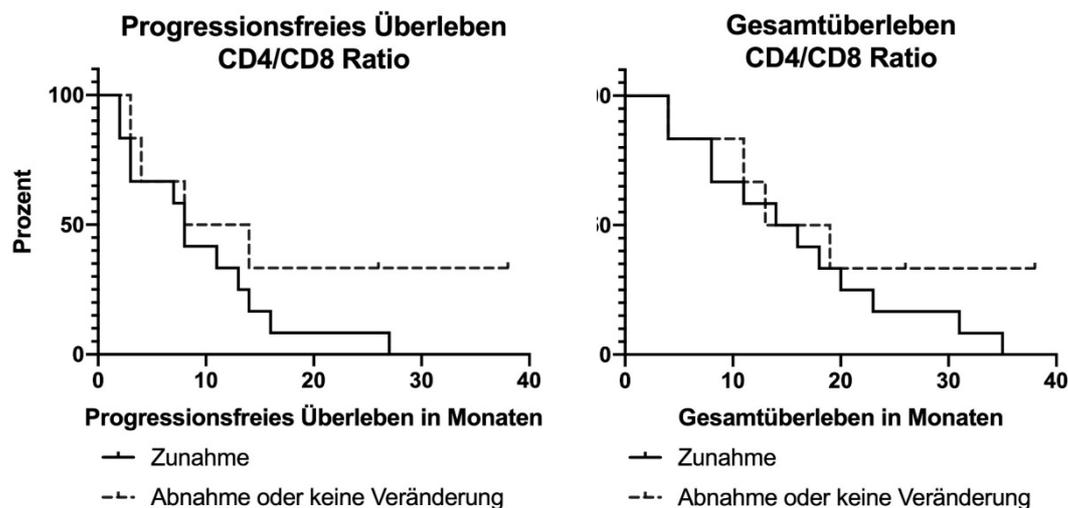
Im Abschnitt 3.3 wurde gezeigt, dass manche Patienten eine deutliche Expressionszunahme bestimmter T-Zellmarker im Verlauf der Chemotherapie zeigten, andere jedoch keine Veränderung oder gar eine Abnahme in der Expression. Daher stellte sich die Frage, ob diese Dynamik der Marker mit der Prognose des einzelnen Patienten korreliert. In der vorliegenden Arbeit sind Patienten, die FOLFIRINOX und Gem/nab-Pac erhalten haben gemeinsam analysiert worden. Im Vorfeld war eine Analyse getrennt nach Chemotherapie-Regimen erfolgt, die zeigte, dass die Unterteilung keinen ausschlaggebenden Effekt auf die Ergebnisse hatte.

Für die Überlebensanalyse hinsichtlich progressionsfreiem- und Gesamtüberleben wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt sowie eine uni- und multivariante Analyse mittels Cox Regression durchgeführt. Hierfür wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe besteht aus Patienten, die eine Zunahme des gewählten T-Zellmarkers zeigten. In der zweiten Gruppe zeigten die Patienten entweder eine Expressionsabnahme oder keine Veränderung.

Der folgende Abschnitt beschränkt sich auf die  $CD4^+$  /  $CD8^+$  Ratio, regulatorische ( $FoxP3^+$ ) T-Zellen sowie die Expression der Immuncheckpoints CTLA-4, PD-1 und TIM-3. Die Marker CCR7, CD62L, CD69 und LAG-3 zeigten keinen Trend in der Überlebensanalyse. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich beim p-Wert jeweils um eine Ermittlung mittels Log-rank Test.

#### **3.5.1 CD4 und CD8 positive T-Zellen**

Es wurde untersucht, ob die Veränderung des Verhältnisses von  $CD4^+$  zu  $CD8^+$  T-Zellen (die sogenannte  $CD4^+$  /  $CD8^+$  Ratio) mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) oder dem Gesamtüberleben (OS) korreliert. Es zeigte sich keine Assoziation zwischen einer Alteration der  $CD4^+$  /  $CD8^+$  Ratio und der Prognose der Patienten (vgl. Abb. 14).



**Abbildung 14: Zunahme der Ratio zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut unter Chemotherapie und Prognose der Patienten**

Die Cox Regression-Überlebensanalyse ergab ebenfalls keine Hinweise auf einen Zusammenhang der Veränderung der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio mit der Prognose der Patienten (Tabelle 17).

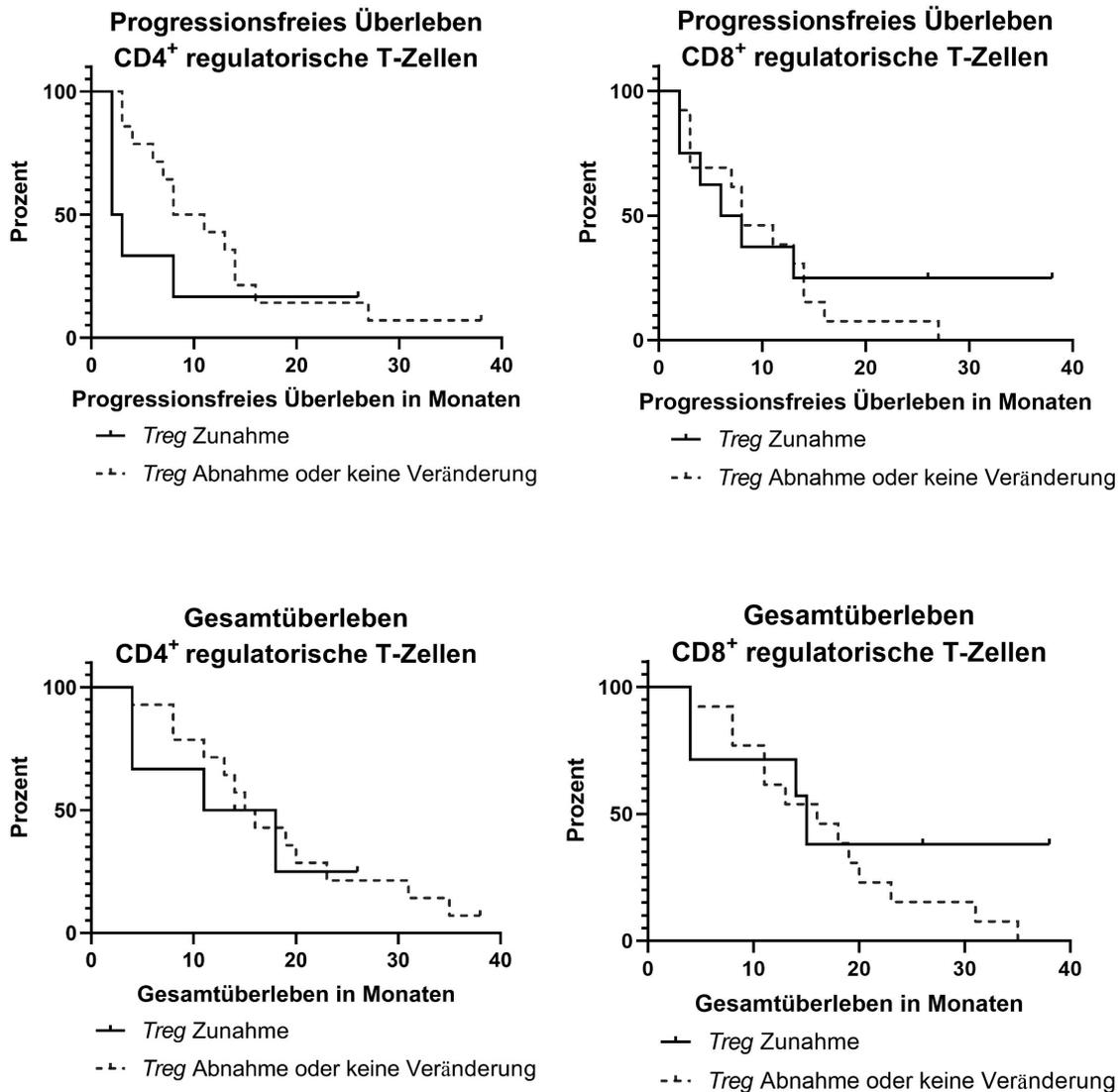
**Tabelle 17: univariante Cox Regression, Einfluss der CD4 und CD8 Expression sowie die CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio auf das PFS und das OS**

	Korrelation mit dem PFS		95% Konfidenzintervall für HR*	
	p-Wert	HR*	unteres	oberes
<b>CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio</b>	0,225	2,023	0,648	6,319
	Korrelation mit dem OS			
<b>CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio</b>	0,352	1,716	0,551	5,346

\*Hazard Ratio

### 3.5.2 FoxP3 positive regulatorische T-Zellen und T-Zell Aktivierungsmarker

Im Folgenden wird auf die Zu- und Abnahme der FoxP3 positiven, regulatorischer T-Zellen eingegangen.



**Abbildung 15: Zunahme von regulatorischen T-Zellen (FoxP3<sup>+</sup>) im peripheren Blut unter Chemotherapie und Prognose.**

Das progressionsfreie Überleben von Patienten, die eine Zunahme an regulatorischen T-Zellen zeigten, war kürzer als das von Patienten, die keine Zunahme zeigten. Das progressionsfreie Überleben betrug in dieser Gruppe im Median nur 2,5 Monate wohingegen die Patienten ohne Zunahme im Median 9,5 Monate keine Progression der Erkrankung zeigten (vgl. Abb. 15). Der Log-rank Test ergab kein signifikantes Ergebnis

( $p=0,263$ ), bei Betrachtung des p-Werts im Gehan-Breslow-Wilcoxon Test (GBW Test) war der Unterschied jedoch signifikant ( $p=0,042$ ). Die Verwendung dieses Tests ist in diesem Zusammenhang möglicherweise sinnvoll, da er im Gegensatz zum Log-rank Test insbesondere frühe Ereignisse stärker gewichtet. Dadurch bekommen Patienten mit einem besonders schlechten PFS mehr Gewicht als solche mit durchschnittlichem PFS. Bei der Betrachtung des Gesamtüberlebens fiel dieser Zusammenhang deutlich geringer aus (medianes OS bei Zunahme: 14,5 Monate, bei Abnahme oder keiner Veränderung: 15,5 Monate,  $p=0,787$ ). Die Analyse der Veränderung von  $CD8^+$  Tregs ergab keinen Hinweis auf eine Korrelation mit der Prognose der Patienten.

**Tabelle 18: univariante Cox Regression. Einfluss der Zunahme von Tregs auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben**

	Korrelation mit dem PFS		95% Konfidenzintervall für HR*	
	p-Wert	HR*	unteres	oberes
<b>CD4<sup>+</sup> Tregs</b>	0,295	1,759	0,612	5,057
<b>CD8<sup>+</sup> Tregs</b>	0,660	0,791	0,279	2,244
	Korrelation mit dem OS			
<b>CD4<sup>+</sup> Tregs</b>	0,792	1,168	0,369	3,694
<b>CD8<sup>+</sup> Tregs</b>	0,375	0,600	0,194	1,856

\*Hazard Ratio

Tregs: regulatorische T-Zellen

In der Cox Regression war kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Zunahme von  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  regulatorischen T-Zellen und der Prognose der Patienten nachzuweisen. Die bereits in der Kaplan Meier Kurve aufgefallene Tendenz zu einem schlechteren PFS bei Zunahme der  $CD4^+$  Tregs bestätigte sich auch in der Cox Regression (HR=1,759, 95% CI 0,612-5,057) (vgl. Tab. 18).

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen einer Zunahme der Expression des Chemokinrezeptors 7, sowie der Aktivierungsmarker CD62L und CD69 und dem progressionsfreien beziehungsweise Gesamtüberleben untersucht. Hierbei zeigte sich kein Hinweis auf eine prognostische Korrelation der Veränderung der CCR7, CD62L oder CD69 Expression mit der Prognose der Patienten.

### 3.5.3 Immuncheckpoints

#### 3.5.3.1 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

Bei der Betrachtung der Expression von CTLA-4 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab sich kein Hinweis auf eine Korrelation zwischen der Veränderung der Expression von CTLA-4 und der Prognose der Patienten.

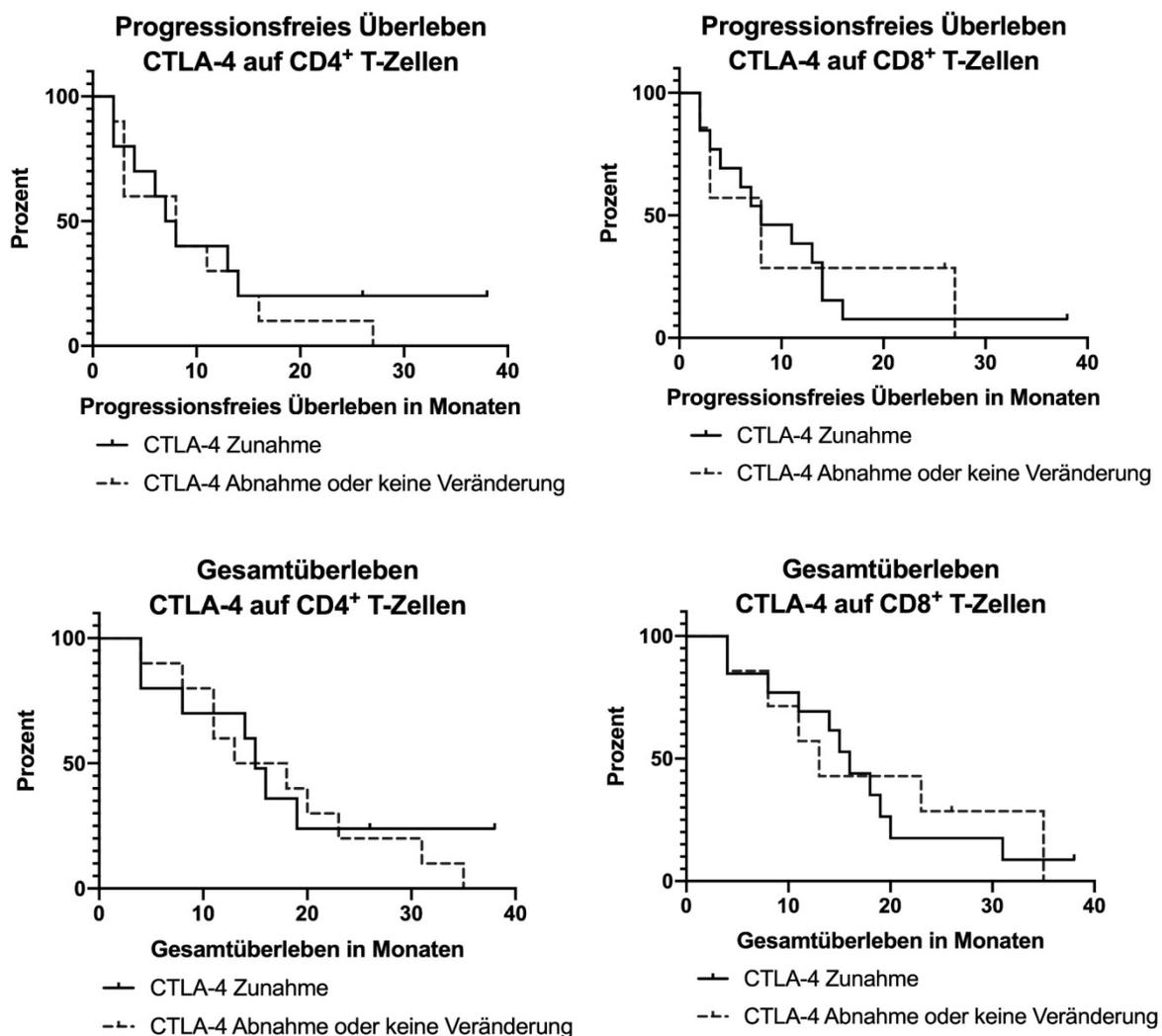
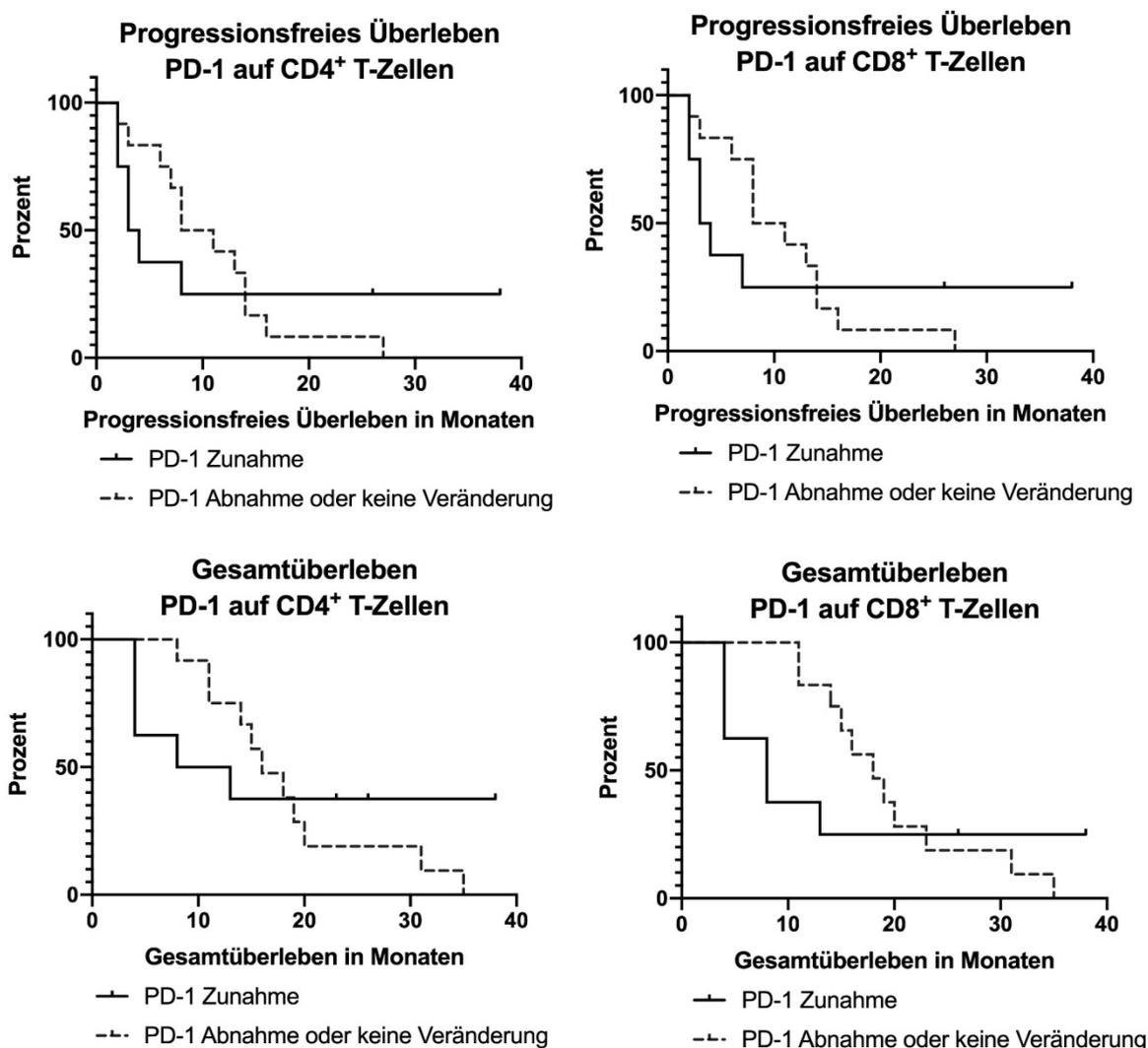


Abbildung 16: Analyse der Zunahme der CTLA-4 Expression auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Prognose

### 3.5.3.2 Programmed cell death protein 1

Sowohl für eine Zunahme der CD4<sup>+</sup>/PD1<sup>+</sup> T-Zellen als auch für eine Zunahme der CD8<sup>+</sup>/PD1<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich eine Assoziation mit einem besonders kurzen progressionsfreien Überleben (Median 3,5 Monate versus 9,5 Monate) (vgl. Abb. 17). Dieser Zusammenhang war statistisch nicht signifikant (p-Wert=0,981 (Log-rank) in der Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und p=0,902 bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen, GBW ebenso nicht statistisch signifikant).



**Abbildung 17: Analyse der Zunahme der PD-1 Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut unter Chemotherapie**

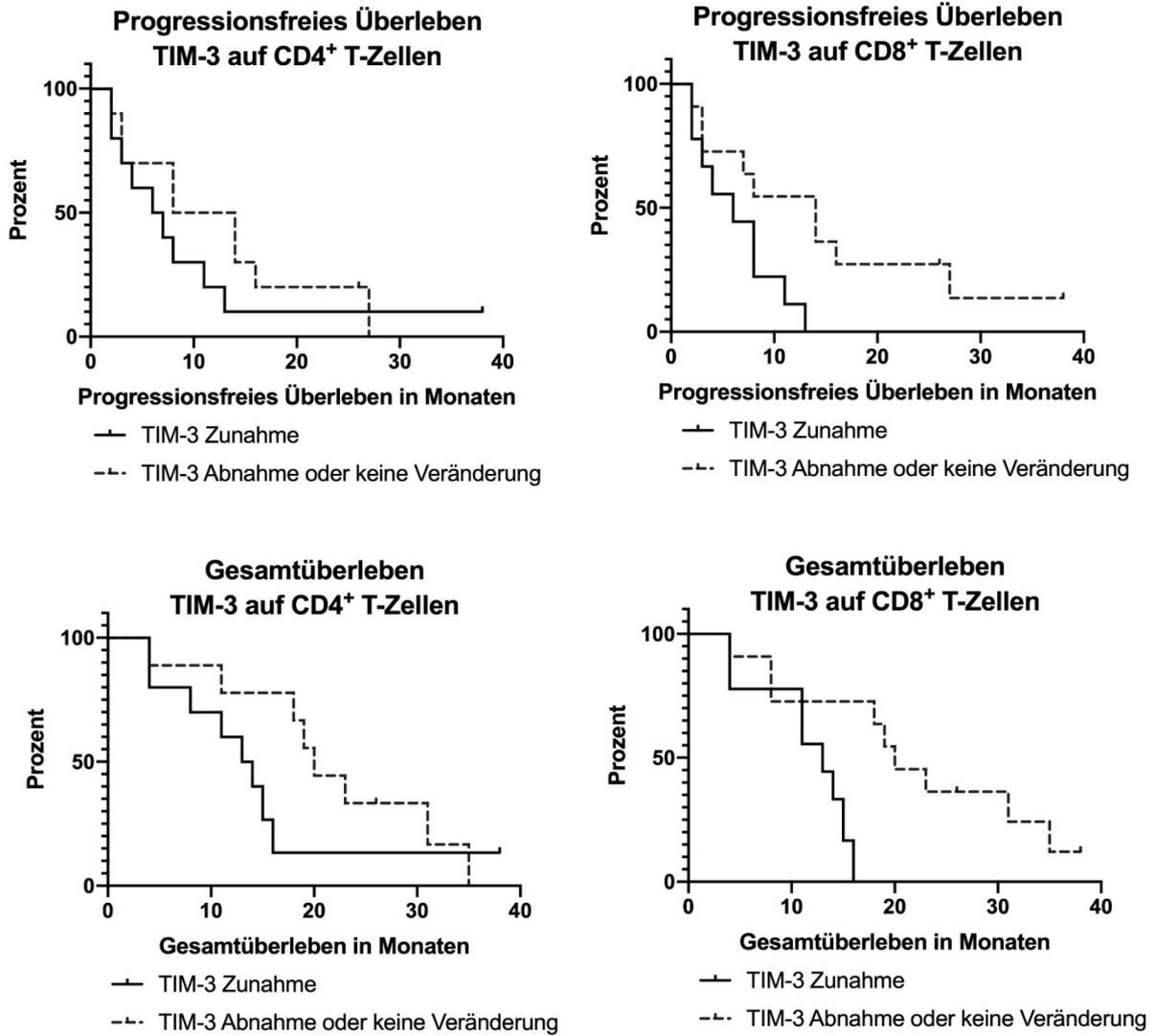
Eine besonders deutliche Tendenz zu einem kürzeren Gesamtüberleben zeigte sich bei Zunahme der CD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> T-Zellen. Das Gesamtüberleben betrug in dieser Gruppe

lediglich 8 Monate, wohingegen es in der Gruppe der Abnahme beziehungsweise keiner Veränderung bei 18 Monaten lag. Diese Tendenz zu einer schlechteren Prognose war im Gehan-Breslow-Wilcoxon Test signifikant mit einem p-Wert 0,042. Der Log-rank Test hingegen ergab kein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert 0,625. Auch hier ist, wie bereits zu FoxP3 erläutert, die Verwendung des GBW Tests möglicherweise sinnvoll, da er insbesondere schlechtes Überleben stärker bewertet. Auch die Zunahme von CD4<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> T-Zellen war mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert. Dieses betrug in dieser Gruppe im Median lediglich 10,5 Monate versus 16 Monate in der Vergleichsgruppe, die keine Zunahme zeigte. Dieser Trend war statistisch nicht signifikant.

In der Cox Regression zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Dynamik der Expression von PD-1 und der Prognose der Patienten.

### **3.5.3.3 T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3**

Die Zunahme der Expression von CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup> T-Zellen zeigte eine statistisch signifikante Korrelation zu einem schlechteren progressionsfreien Überleben (p=0,026) und Gesamtüberleben (p=0,011). Das progressionsfreie Überleben betrug in der Gruppe der Zunahme lediglich 6 Monate (versus 14 Monate ohne Zunahme) und das Gesamtüberleben 13 Monate (versus 20 Monate ohne Zunahme). Wenn auch nicht so deutlich, zeigte sich dieser Trend auch bei der Betrachtung der CD4<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup> T-Zellen. Hier betrug das progressionsfreie Überleben 6,5 Monate in der Gruppe der Zunahme (versus 11 Monate ohne Zunahme der CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup> Expression) (p=0,331). Das Gesamtüberleben war ebenfalls kürzer in der Gruppe der Zunahme mit 13,5 Monaten versus 20 Monaten ohne Zunahme der Expression (p=0,240). Die Analyse mittels Cox Regression ergab ebenfalls einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Prognose und einer Zunahme der TIM-3 Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser war sowohl für das progressionsfreie als auch für das Gesamtüberleben nachweisbar (HR: 3,16, p=0,043 beziehungsweise HR: 4,98, p=0,023). Für die CD4<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup> Expression war auch in der Cox Regression keine statistisch signifikante Korrelation zur Prognose der Patienten nachweisbar.



**Abbildung 18: Analyse der Zunahme der Expression von TIM-3 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Prognose**

**Tabelle 19: univariante Cox Regression. Korrelation der Zunahme von CTLA-4, PD-1 und TIM-3 nach CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der Prognose.**

		Korrelation mit dem PFS		95% Konfidenzintervall für HR	
		p-Wert	HR*	unteres	oberes
<b>CD4<sup>+</sup></b>	CTLA-4	0,652	0,807	0,318	2,049
	PD-1	0,981	0,988	0,366	2,669
	TIM-3	0,357	1,564	0,604	4,054
<b>CD8<sup>+</sup></b>	CTLA-4	0,870	1,086	0,404	2,916
	PD-1	0,907	1,062	0,390	2,891
	TIM-3	<b>0,043</b>	<b>3,163</b>	1,035	9,663
		Korrelation mit dem OS		95% Konfidenzintervall für HR	
		p-Wert	HR*	unteres	oberes
<b>CD4<sup>+</sup></b>	CTLA-4	0,691	0,821	0,310	2,174
	PD-1	0,898	0,936	0,339	2,580
	TIM-3	0,359	1,598	0,586	4,358
<b>CD8<sup>+</sup></b>	CTLA-4	0,858	1,096	0,399	3,010
	PD-1	0,632	1,282	0,464	3,545
	TIM-3	<b>0,023</b>	<b>4,984</b>	1,245	19,958

\*Hazard Ratio

## **4. Diskussion der Ergebnisse**

Im Rahmen des ersten Teils dieser Arbeit wurde zunächst die Aufreinigung und Asservierung von PBMC von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom etabliert. Dies bildete die Grundlage um die dynamische Veränderung verschiedener T-Zellpopulationen und T-Zellmarker unter einer palliativen Chemotherapie untersuchen zu können. Zudem wurde für tiefergehende Analysen die Isolation von RNA aus PBMC etabliert. In einem zweiten Schritt wurden dann von 28 Patienten PBMC direkt vor Einleitung der palliativen Chemotherapie isoliert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die folgenden Analysen archiviert. Eine zweite Blutentnahme mit nachfolgender PBMC und RNA-Isolation wurde 30 Tage nach Einleitung der palliativen Chemotherapie vorgenommen. Im dritten Schritt wurden die PBMC von 20 Patienten, die alle Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper und Durchflusszytometrie auf unterschiedliche T-Zellsubpopulationen sowie die Expression verschiedener T-Zellmarker auf  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen untersucht. Den letzten Schritt bildete die Korrelation der durchflusszytometrischen Messungen mit dem Überleben der Patienten. Im Folgenden sollen die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und im Vergleich mit aktuellen Forschungsergebnissen betrachtet werden.

### **4.1 Die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und Ribonukleinsäure**

Schlussendlich konnten von den ursprünglich 28 Patienten 20 Patienten eingeschlossen werden. Die Isolation von PBMC aus Vollblutproben der Patienten erfolgte unter der Verwendung des Protokolls aus dem Labor für experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung. Im Anschluss an die Isolation wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  unter Verwendung eines DMSO/FBS Gemischs eingefroren. Die Proben konnte nach mehreren Monaten erfolgreich aufgetaut und durchflusszytometrisch untersucht werden. Somit konnte die Kryoasservierung von PBMC von Patienten mit PDAC etabliert und das Projekt verwirklicht werden.

Bei der Isolation von RNA stellte insbesondere die Reinhaltung der Probe eine Herausforderung dar. Die Ergebnisse der RNA Isolation sowie die Reinheit der Proben sprechen dafür, dass in den Proben nur geringe Verunreinigungen vorhanden sind. Die

Menge der isolierten RNA variierte teilweise deutlich. Diese ist vermutlich hauptsächlich durch Unterschiede in der PBMC Menge zu erklären.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierte RNA soll im Verlauf eines weiterführenden Projekts mittels RNA Sequenzierung untersucht werden. Dies könnte ein noch deutlich differenzierteres Bild der immunologischen Veränderungen unter Chemotherapie bei Patienten mit PDAC ermöglichen (Papalexí 2018).

## **4.2 Einordnung und klinische Signifikanz der Patientencharakteristika**

Für die im Rahmen der Studie untersuchten Patienten ergab sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 8 Monaten (Gemcitabin & nab-Paclitaxel: 6 Monate, FOLFIRINOX: 8 Monate). Das mediane Gesamtüberleben lag bei 15 Monaten (Gemcitabin & nab-Paclitaxel: 14 Monate, FOLFIRINOX: 15 Monate). Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Literatur so lässt sich feststellen, dass sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben etwas länger als in vergleichbaren Studien war. Beispielsweise beschreiben von Hoff et. al. in der Zulassungsstudie für Gemcitabin & nab-Paclitaxel ein medianes PFS von 5,5 Monaten und ein medianes Gesamtüberleben von 8,5 Monaten (Von Hoff 2013). Conroy et al. beobachteten für FOLFIRINOX ein medianes PFS von 6,4 Monaten und ein medianes OS von 11,1 Monaten (Conroy 2011) (Tabelle 21). Dieser Unterschied im PFS und OS lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sowohl Conroy et al. als auch von Hoff et al. nur Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom untersuchten, wohingegen in der vorliegenden Arbeit auch lokal fortgeschrittene Tumore berücksichtigt wurden.

**Tabelle 20: Darstellung der Ergebnisse verschiedener klinischer Studien zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom**

<b>Publikation</b>	<b>n</b>	<b>Untersuchte Therapieregime</b>	<b>PFS</b>	<b>OS</b>
<b>(Conroy 2011)</b>	342	FOLFIRINOX	6,4 Monate	11,1 Monate
		Gemcitabin	3,3 Monate	6,4 Monate
<b>(Von Hoff 2013)</b>	861	Gemcitabin nab-Paclitaxel	5,5 Monate	8,5 Monate
		Gemcitabin	3,7 Monate	6,7 Monate

*N = Anzahl der untersuchten Personen*

*PFS = progression-free survival*

*OS = overall survival*

Das mediane Alter der Patienten in dieser Studie lag bei 61 Jahren und war damit vergleichbar zu den Patientenkohorten, welche von Hoff et al. und Conroy et al. untersuchten (Conroy 2011, Von Hoff 2013). Insgesamt liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom deutlich höher. Ein möglicher Grund für das verhältnismäßig junge Alter unserer Kohorte ist sicherlich in den Auswahlkriterien zu suchen (Therapie mit FOLFIRINOX oder Gemcitabin & nab-Paclitaxel). Diese intensiven Therapieregime werden analog zu den Einschlusskriterien der jeweiligen Phase III-Studie vor allem bei jüngeren Patienten in gutem bis sehr gutem Allgemeinzustand angewendet (Conroy 2011, Robert-Koch-Institut 2016).

In der Literatur sowie der klinischen Anwendung sind eine Vielzahl an klinischen Prognosefaktoren etabliert worden (vgl. Tab. 20). In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten klinischen Parametern und der Prognose der Patienten festgestellt werden, was vermutlich auch auf die limitierte Patientenzahl zurückgeführt werden kann.

**Tabelle 21: Darstellung der Ergebnisse verschiedener Studien zum Einfluss klinischer Parameter auf die Prognose von Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas**

Publikation	n	Endpunkt	Behandlung	Signifikante negative Prognose-faktoren
<b>(Morizane 2011)</b>	409	OS	Gemcitabin-haltige Chemotherapie	Lebermetastasen, erhöhtes CA19-9, erhöhtes CEA
<b>(Kurihara 2015)</b>	182	-	Gemcitabin-haltige Chemotherapie	<i>Performance</i> -Status (ECOG), Tumorstadium
<b>(Huang 2019)</b>	727	OS	Gem-basiert, FOLFIRINOX, 5-FU+X, Gem mono, 5-FU mono	<i>Performance</i> -Status (ECOG), Tumorstadium
<b>(Chang 2019)</b>	111	OS	Gemcitabin-haltige Chemotherapie	<i>Performance</i> -Status (ECOG), Vorhandensein von Fernmetastasen

*N* = Anzahl der untersuchten Personen

OS = overall survival

Obwohl das seit circa 1980 verwendete CA19-9 nicht Diagnostik eines Pankreaskarzinoms geeignet ist, gilt es als wichtiger Parameter in der Beurteilung des Therapieansprechens und der Prognose von Patienten mit PDAC (Duffy 2010, Steinberg 1990). Es gibt eine starke Evidenz, dass insbesondere die Kinetik des CA 19-9 Werts im Verlauf der Chemotherapie einen guten Hinweis auf Therapieansprechen und Prognose der Patienten darstellt (Haas 2010). Im Falle von CEA konnten große retrospektive Studien einen Zusammenhang zwischen einem schlechteren OS und einem CEA Wert > 5 ng/ml nachweisen (Imaoka 2016, Meng 2017). In dieser Arbeit konnte zwar kein Zusammenhang zwischen einem schlechteren PFS und OS und erhöhtem CA 19-9 oder CEA vor Therapiebeginn festgestellt werden, dies kann jedoch insbesondere durch die kleinere Patientenzahl bedingt sein.

### 4.3 Veränderungen in der Expression von T-Zellmarkern

Zum jetzigen Zeitpunkt konnte keine prognoseverbessernden Kombinationstherapien aus Chemotherapie und immuntherapeutischen Ansätzen für Patienten mit PDAC identifiziert werden. Beispielsweise konnten aktuelle Daten aus einer Phase I Studie mit Gemcitabin und Ipilimumab (humaner monoklonaler CTLA-4 Antikörper) an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom keinen Vorteil der Kombinationstherapie im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie belegen (Kamath 2019). Daher ist es essentiell in weitere Daten bezüglich der Veränderung des Funktionsstatus von T-Zellen unter einer Chemotherapie zu sammeln.

In unserer Arbeit konnten Veränderungen in der Expression von T-Zellmarkern im Verlauf der Therapie festgestellt werden. Während kleinere Veränderungen durchaus durch normale Variationen oder Messungenauigkeiten bedingt sein können, sind deutliche Zu- oder Abnahmen vermutlich Hinweise auf Veränderungen im immunologischen Status des Patienten. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur wenige Daten zur dynamischen Veränderung unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen oder der Expression von T-Zellmarkern unter einer palliativen Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom. Ein Beispiel ist die Abnahme von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut unter einer Therapie mit Gemcitabin bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom (Homma 2014).

In unserer Studie zeigten sich teils deutliche Veränderungen der regulatorischen T-Zellen, CCR7<sup>+</sup> T-Zellen sowie der Expression von T-Zell Aktivierungsmarker (CD62L) sowie der *Imm checkpoints* (CTLA-4 und PD-1). Im Vergleich der unterschiedlichen Marker war in verschiedenen Korrelationsanalysen keine klare Korrelation zwischen der Expressionsänderung verschiedener Marker erkennbar. In der Regel sind auf CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen mehrere inhibitorische Marker, wie TIM-3, LAG-3, PD-1 oder CTLA-4 exprimiert (Baitsch 2012). Eine gerichtete Zu- oder Abnahme dieser Marker würde für einen immunologischen Effekt der Chemotherapie sprechen. Dies war aber in unserer Studie nicht nachzuweisen. Zudem bleibt unklar, inwiefern sich die erwähnten Marker ohne Chemotherapie im natürlichen Verlauf der Erkrankung verändern würden. Letztlich war aufgrund der Patientenzahl in unserer Pilotstudie eine Analyse der simultanen Expressionsänderung mehrerer T-Zellmarker nur eingeschränkt möglich.

## 4.4 Prognostische Signifikanz der Veränderungen in T-Zellsubpopulationen, T-Zellaktivierungsmarkern sowie Immuncheckpoints

### 4.4.1 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio

Als wichtiger Faktor in der Immunologie gilt die Balance zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, für welche seit langem bei vielen Malignitäten eine Korrelation mit der Prognose identifiziert worden ist (Hernberg 1996, Tao 2016). Dennoch gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Daten bezüglich der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio bei Patienten mit PDAC. In der Studie von Yang et al. konnte gezeigt werden, dass eine CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio > 1,8 im peripheren Blut von Patienten mit fortgeschrittenem PDAC vor Therapiebeginn ein negativ prognostischer Faktor ist (Yang 2017). Bezüglich des *cut-offs* für eine „normale“ CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio bei gesunden Personen besteht jedoch Uneinigkeit. In der Regel gelten Werte >2,0 als pathologisch. In unserer Studie war eine erhöhte CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio nicht signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Bei anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem metastasiertem malignen Melanom konnte eine Veränderung der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio unter Chemotherapie aufgezeigt werden (Muhonen 1994). Bisher fehlen unseres Wissens nach Studien bezüglich der prognostischen Relevanz einer Veränderung der CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Ratio im peripheren Blut unter einer palliativen Chemotherapie bei Patienten mit PDAC.

### 4.4.2 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen nehmen eine wichtige Funktion in der Immunevasion maligner Tumorerkrankungen ein. Entsprechend konnte für verschiedene Tumorerkrankungen eine Korrelation zwischen schlechter Prognose und einer Zunahme regulatorischer T-Zellen (*Tregs*) im peripheren Blut gezeigt werden. Auch für das Pankreaskarzinom existieren hier bereits Daten: Beispielsweise konnten Lui et al zeigen, dass eine Abnahme der zirkulierenden *Tregs* bei Patienten mit PDAC unter einer Gemcitabin-basierter Chemotherapie mit einem besseren Gesamtüberleben korreliert (Liu 2017). Des Weiteren stellten Yamamoto et al. dar, dass Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs eines PDAC nach Resektion deutlich erhöhte zirkulierende CD4<sup>+</sup>/*Treg* Level zeigten, als unmittelbar nach Resektion (Yamamoto 2012). Ikemoto et al. stellten bei der Untersuchung von *Tregs*

im peripheren Blut bei Patienten mit PDAC eine Assoziation mit einem höheren TNM Stadium fest (Ikemoto 2006). Bezüglich der Veränderung der *Tregs* unter Chemotherapie konnten Roselli et al. an Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Assoziation zwischen einer Zunahme der *Tregs* und einem verkürzten OS nachweisen (p-Wert: 0,036) (Roselli 2016).

Des Weiteren gab es mehrere Untersuchungen der *Tregs* im Tumorgewebe (Santos 2017). Wartenberg et al. fanden einen Zusammenhang zwischen peritumoralem und intratumoralem *Tregs* und fortgeschrittenen Tumorstadien (venöser oder lymphatischer Invasion, N1-Status) (Wartenberg 2015). Interessanter Weise konnten Diana et al im Gegensatz dazu bei einer ähnlichen Untersuchung von Pankreasresektaten keinen Zusammenhang zwischen OS oder PFS und der Anzahl an *Tregs* im Tumor oder der peritumoralen Umgebung nachweisen (Diana 2016).

Im Rahmen unserer Analyse konnte ein Trend zu einem schlechteren PFS bei Zunahme der *Tregs* im peripheren Blut unter Chemotherapie nachgewiesen werden (vergleiche Abschnitt 3.6.2), welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Insgesamt liegen zu dieser Thematik bislang nur wenige Daten vor.

In einer vergleichbaren Studie von Homma et al. wurde die Veränderung in der Expression regulatorischer T-Zellen nach 2 Wochen einer Gemcitabin-haltigen Chemotherapie untersucht (Homma 2014). Aufgrund des Unterschieds im Zeitintervall ist der direkte Vergleich zur vorliegenden Arbeit nur sehr eingeschränkt möglich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es eine deutliche Evidenz dafür gibt, dass eine erhöhte Anzahl an *Tregs* im peripheren Blut einen negativen Prädiktor für die Prognose der Patienten darstellt. Unsere Daten deuten darauf hin, dass hier möglicherweise auch die Zunahme unter Chemotherapie ein negativer Prognosefaktor für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sein könnte. Das Monitoring dieser Veränderungen könnte ein hilfreicher Marker zur Abschätzungen der Prognose sein und sollte in weiteren Studien untersucht werden (Yamamoto 2012).

### 4.4.3 Chemokinrezeptor 7

Die Rolle von CCR7 bei PDAC ist Gegenstand von mehreren wissenschaftlichen Untersuchungen. Diese zeigten bisher eine Bedeutung von CCR7 für Tumorprogression und Metastasierung (vgl. Abschnitt 1.2.2.2) und eine erhöhte CCR7 Expression im Gewebe von Pankreasresektaten konnte mit einem schlechteren OS assoziiert werden (Nakata 2008, Zhao 2011, Zu 2019). Eine Untersuchung der Dynamik der CCR7 Expression auf PBMC bei Patienten mit PDAC im Verlauf der Chemotherapie wurde unseres Wissens nach noch nicht durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte CCR7 als nicht relevant für die Abschätzung der Prognose von Patienten mit PDAC identifiziert werden.

### 4.4.4 Aktivierungsmarker

CD62L und CD69 sind Indikatoren für den Aktivierungsstatus der T-Zelle (vgl. Abschnitt 1.2.2.3). Eine T-Zellaktivierung kann beispielsweise durch einen immunogenen Zelltod von Tumorzellen ausgelöst werden (Opzoomer 2019). Ein solcher immunogener Zelltod wurde beispielsweise für die Behandlung mit Oxaliplatin-haltigen Chemotherapieregimen beschrieben (Limagne 2019). Eine vermehrte CD62L oder CD69 Expression ist häufig bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankung zu beobachten und geht mit einer schlechten Prognose einher (vgl. Abschnitt 1.2.2.3).

**CD62L** spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Fernmetastasen bei verschiedenen Tumorentitäten, wie dem hepatozellulären Karzinom oder dem Pankreaskarzinom (Borsig 2018, Häuselmann 2014, Jin 2020, St Hill 2011).

Grage-Griebenow et al. zeigten, dass die Expression von **CD69** auf Effektor T-Zellen weitere T-Zell Proliferation hemmt (Grage-Griebenow 2014). Zudem konnten diese Gruppe nachweisen, dass Patienten mit PDAC im Tumorgewebe erhöhte CD4<sup>+</sup>/CD69 T-Zell Level aufweisen, was mit einem höheren Tumorgrading assoziiert ist (Grage-Griebenow 2014). Doch fehlen bisher Daten bezüglich einer prognostischen Aussage von der Expression von CD69 auf PBMC bei Patienten mit PDAC. Am Beispiel des hepatozellulären Karzinoms konnte eine Assoziation zwischen CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Expression und einem erhöhten Tumorstadium gefunden werden (Zhu 2011).

Zusammenfassend gibt es deutliche Hinweise auf eine Assoziation von erhöhter CD69 und CD62L Expression und einer schlechteren Prognose von Patienten mit PDAC. In unserer Arbeit konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Expression von CD62L und CD69 auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Z-Zellen im peripheren Blut sowie der Prognose der Patienten hergestellt werden. Weshalb dies in unserer Studie ausblieb, ist noch unklar. Gegebenenfalls war die Zahl an Probanden nicht ausreichend, um einen Effekt darzustellen.

#### 4.4.5 Immuncheckpoints

**CTLA-4** gehört zu den am besten untersuchten T-Zellmarkern und die Blockade von CTLA-4 mittels monoklonaler Antikörper hat bei einigen Tumorentitäten zu beeindruckenden Ergebnissen geführt. Diese Verbesserung der Prognose der Patienten konnte jedoch bei Patienten mit PDAC nicht nachgewiesen werden (Kunk 2016). Daher stellt sich die Frage welche Rolle CTLA-4 bei PDAC einnimmt. Unser Ziel war es, herauszufinden, ob eine Zunahme der CTLA-4 Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der Chemotherapie einen Hinweis auf die Prognose der Patienten liefern kann. Da CTLA-4 einen der prominentesten T-Zellmarkern darstellt, gibt es hierzu etliche Studien, von denen einzelne im Folgenden näher dargestellt werden sollen:

Farren et al. untersuchten die Expression von CTLA-4 auf PBMC vor Beginn einer systemischen Chemotherapie bei Patienten mit metastasiertem PDAC (Farren 2016). Sie konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von CTLA-4 auf CD8<sup>+</sup> PBMC vor Therapiebeginn mit einem schlechteren OS assoziiert war (Farren 2016). Daher ist es wichtig auch die Rolle von CTLA-4 in der Entstehung des Tumormicroenvironments von PDAC zu verstehen. Untersuchungen des Tumorgewebes zeigen, dass die Expression von Immuncheckpoints wie CTLA-4 und PD-1 maßgeblich zur Immunevasion des PDAC beiträgt (Connor 2017). Zusätzlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei PDAC die Blockade von CTLA-4 die Infiltration des Tumorgewebes mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen stärken kann (Bensch 2017). Dies liefert Hinweise auf die komplexe Bedeutung von CTLA<sup>+</sup> T-Zellen in dem Prozess des Tumorprogresses und unterstreicht die Bedeutung von weiterführenden Untersuchungen. Diese könnten helfen Patientengruppen zu identifizieren, die von einer CTLA-4 Blockade profitieren würden.

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen einer Zunahme der CTLA-4 Expression auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut und der Prognose der Patienten hergestellt werden. Aufgrund des Unterschieds im Beobachtungszeitraum ist ein direkter Vergleich der Studien jedoch wahrscheinlich nur eingeschränkt möglich.

In ähnlicher Weise wie bei CTLA-4 hat auch die Blockade von **PD-1** mittels Antikörpern die Therapie vieler Tumorentitäten verbessert und hervorragende Ergebnisse erbracht. Dieser Effekt bleibt jedoch bei Patienten mit PDAC aus (Kunk 2016). Daher ist es essentiell die Rolle von PD-1 bei PDAC zu verstehen. In unserer Analyse ergaben sich Hinweise darauf, dass die Zunahme der PD-1 Expression in Verlauf der Chemotherapie mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert ist. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei der Untersuchung des OS bei Patienten, die eine Zunahme der PD-1 Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten. Dieser Effekt war im Gehan-Breslow-Wilcoxon Test signifikant, mittels Log-rank Test jedoch nicht. Da aufgrund der kleinen Patientenzahl eine Interpretation der Ergebnisse ohnehin nur mit Vorbehalten möglich ist, dient der Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test durch eine veränderte Wichtung zugunsten von frühen Todesfällen dazu den Trend zu verstärken (Hazra 2017). Zusammenfassend kann man postulieren, dass sich in der vorliegenden Arbeit ein Trend zu einer schlechteren Prognose bei einer Zunahme der PD-1 Expression innerhalb der ersten 30 Tage einer systemischen Therapie mit Gem nab-pac oder FOLFIRINOX auf PBMC andeutet. Da PD-1, wie auch CTLA-4, zu den bedeutendsten und am besten untersuchten T-Zellmarker gehört, sollen im Folgenden einige Studien, die die PD-1 Expression bei Patienten mit PDAC untersuchen, dargestellt werden:

Bei der Analyse der Expression von PD-1 auf zirkulierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben Shen et al. eine Korrelation mit einer hohen Expression und höherem Tumorstadium gefunden (Shen 2017). Interessanter Weise konnten Farren et al. im Gegensatz dazu bei der Untersuchung einer Korrelation zwischen der Expression von PD-1 auf PBMC bei Patienten mit PDAC keinen Trend feststellen (Farren 2016).

Shen et al. untersuchten zusätzlich zu PD-1 auf PBMC auch PD-1 auf Tumorinfiltrierenden Leukozyten (Santos) und fanden hier ebenfalls eine Assoziation zwischen einem schlechteren Outcome und einer erhöhten PD-1 Expression (Shen 2017). Die Betrachtung der TIL ist interessant, da es (beispielsweise bei Patienten mit malignem

Melanom) Hinweise darauf gibt, dass die PD-1 Expression auf CD8<sup>+</sup> PBMC mit der PD-1 Expression auf TIL korrelieren könnte und somit auf weniger invasive Weise Einblicke in den Immunstatus des Tumors geben könnte (Gros 2016). Eine Analyse dieses Zusammenhangs bei Patienten mit PDAC steht unseres Wissens nach zu diesem Zeitpunkt noch aus.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bezüglich der Korrelation der PD-1 Expression auf T-Zellen und der Prognose von Patienten mit PDAC teils widersprüchliche Daten existieren. Dies deutet auf die sehr komplexen Zusammenhänge in der Tumorummunologie des PDAC hin und verdeutlicht nochmals die große Notwendigkeit weiterführender großer, kontrollierter Studien.

Im Gegensatz zu PD-1 und CTLA-4 gehören TIM-3 und LAG-3 zu den „neueren“ Immuncheckpoints. Insbesondere TIM-3 gilt als interessanter immunologischer Angriffspunkt in zukünftigen immunmodulatorischen Tumorthapien (Du 2017). Insbesondere in diesem Hinblick sind die folgenden Ergebnisse bezüglich TIM-3 von Bedeutung:

In der vorliegenden Arbeit ergab die Analyse von **TIM-3** auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen Trend in Richtung einer ungünstigen Prognose bei Zunahme der CD4<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup> T-Zellen. Bei der Analyse von CD8<sup>+</sup>/TIM-3 zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zunahme der Expression und einem kürzeren OS und PFS, welche im Log-rank Test signifikant war. Dies zeigte sich sowohl in den Kaplan-Meier Kurven als auch in der univarianten Cox Regression. Somit könnte gemäß unseren Ergebnissen eine Zunahme der CD8<sup>+</sup>/TIM-3 Expression als negativ prognostischer Marker gewertet werden.

Im Vergleich mit der Literatur fand sich interessanter Weise, dass Farren et al. bei einer Analyse der TIM-3 Expression auf PBMC bei Patienten mit PDAC einen positiven Zusammenhang zwischen einem besseren OS und einer verstärkten TIM-3 Expression feststellten (Farren 2016). Im Gegensatz dazu untersuchten Peng et al. die Expression von TIM-3 auf PDAC Tumorgewebe und kamen zu dem Schluss, dass eine verstärkte Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert (Peng 2017).

Aufgrund der zuvor dargestellten, teils widersprüchlichen Datenlage zu TIM-3 bei PDAC ist es schwer die prognostische Bedeutung dieses *Immuncheckpoints* einzuschätzen und

es bleibt abzuwarten, ob eine TIM-3 Blockade anti-Tumor Aktivität verstärken kann (Farren 2016). Dementsprechend bleiben bezüglich der Relevanz von TIM-3 bei Tumorimmunität und auch seiner Rolle als Angriffspunkt für zukünftige Therapien einige Fragen offen. Es bleiben weitere Untersuchungen bezüglich der TIM-3 Expression, seiner prognostischen Bedeutung und dem Effekt einer TIM-3 Blockade abzuwarten.

Obwohl **LAG-3** auch als interessanter Angriffspunkt in der Tumorthherapie gehandelt wird, konnte in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf eine Korrelation der LAG-3 Expression auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut und der Prognose Patienten mit PDAC gefunden werden. Aktuell werden Studien mit PD-1/LAG-3 Antikörpern zur Therapie solider Tumoren geplant (Cebada 2020). Studien zum Thema LAG-3 Expression auf PBMC bei Patienten mit PDAC wurden unseres Wissens nach bisher nicht publiziert.

#### **4.4.6 Ausblick auf mögliche Kombinationen von immunmodulatorischen Antikörpern und etablierten Chemotherapieregimen**

Wie bereits im Abschnitt 4.3 dargestellt, konnten in der vorliegenden Arbeit keine spezifischen Veränderungen in der Expression der untersuchten T-Zellmarker im Verlauf der Chemotherapie festgestellt werden. Somit ließ sich keine eindeutige Immunaktivierung durch die Gabe von Gemcitabin nab-Paclitaxel oder FOLFIRINOX nachweisen. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich jedoch Trends zwischen einer Zunahme der regulatorischen T-Zellen sowie PD-1<sup>+</sup> und TIM-3<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut und einer schlechteren Prognose der Patienten mit PDAC. Im Hinblick darauf ergibt sich die Frage, ob bei diesen Patienten gegebenenfalls die Kombination einer immunmodulatorischen Therapie sowie etablierten Chemotherapieregimen einen vielversprechenden Ansatz darstellen könnte. Es bleibt zu hoffen, dass Studien, wie die vorliegende Arbeit, tiefere Einblicke in die Dynamik der Tumorimmunologie des PDAC liefern können. Zukünftig könnten sich somit Möglichkeiten ergeben Patienten zu identifizieren, die von einer zusätzlichen immunmodulatorischen Therapie profitieren könnten.

## 5. Zusammenfassung der Arbeit

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) gehört zu den häufigen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts und stellt trotz der Verwendung aggressiver Chemotherapieregime deutschlandweit den Tumor mit der höchsten Mortalität dar. Zu den therapeutischen Möglichkeiten bei fortgeschrittenem PDAC gehören Gemcitabin & nab-Paclitaxel oder das FOLFIRINOX Schema (Folsäure, Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin). Trotz beeindruckender Ergebnisse bei anderen Tumorentitäten waren bisherige klinische Studien mit *Checkpoint*-Inhibitoren für Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas nicht erfolgreich. Sowohl für Gemcitabin, Oxaliplatin als auch Fluorouracil konnten immunologische Effekte nachgewiesen werden, die über den sogenannten „immunogenen Zelltod“ die Immunogenität des Tumors erhöhen können und deren Auswirkungen bei Patienten mit Pankreaskarzinom bisher noch unzureichend untersucht sind.

Ziel unserer Arbeit war es, den Einfluss der genannten Chemotherapieregime auf regulatorische T-Zellen, T-Zell Aktivierungsmarker und Immuncheckpoint-Moleküle zu untersuchen und damit der Frage nachzugehen, wie die Chemotherapeutika und das Immunsystem interagieren. Zunächst wurden PBMC und RNA aus Vollblut von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem PDAC vor Beginn und nach 30 Tagen der Chemotherapie mit Gemcitabin & nab-Paclitaxel oder FOLFIRINOX isoliert. Letztlich konnten zwei konsekutive Proben von 20 Patienten gesammelt und ausgewertet werden. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von CD3, CD4, CD8, der Aktivierungsmarker CD62L und CD69, von CCR7, FoxP3 (regulatorische T-Zellen) und Immuncheckpoints (CTLA-4, LAG-3, PD-1 und TIM-3) auf den PBMC gemessen.

Eine besonders deutliche Veränderung über die 30 Tage zeigten die regulatorischen T-Zellen (FOXP3<sup>+</sup>), CCR7, der T-Zell Aktivierungsmarker CD62L sowie die Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1. Ein klares Muster für die Zu- oder Abnahme unterschiedlicher Marker ließ sich jedoch nicht erkennen. Daher ließ sich keine klare Aussage über die Immunogenität der genannten Chemotherapeutika bei Patienten mit PDAC ableiten.

Zudem wurde der Frage nachgegangen, ob die Zunahme eines bestimmten Markers auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der klinischen Prognose der Patienten korreliert. Für die Abschätzung der Prognose wurde das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) verwendet. Es wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven erstellt sowie eine uni- und multivariante Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei zeigten sich die folgenden Ergebnisse:

Es konnte ein Trend zu einem schlechteren PFS bei Zunahme der CD4<sup>+</sup> *Tregs* nachgewiesen werden. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass die Zunahme der PD-1 Expression in Verlauf der Chemotherapie mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert ist. Besonders deutlich präsentierte sich diese Korrelation bei der Untersuchung des OS bei Patienten, die eine Zunahme der PD-1 Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten. Des Weiteren lieferte die Analyse von TIM-3 einen Trend in Richtung einer schlechteren Prognose bei Zunahme der CD4<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup> T-Zellen. Bei der Analyse von CD8<sup>+</sup>/TIM-3 zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Zunahme der Expression und einem kürzeren OS und PFS. Somit könnte eine Zunahme der *Tregs*, sowie der PD-1 oder TIM-3 Expression einen Indikator für eine ungünstige Prognose darstellen. Für die restlichen untersuchten Marker ergaben sich keine Trends zwischen der Prognose der Patienten und der Zu- oder Abnahme der Expression der Marker im Verlauf der Chemotherapie.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Arbeit weiterführende Einblicke in immunologische Veränderungen bei Patienten mit PDAC unter einer Therapie mit Gemcitabin & nab-Paclitaxel oder FOLFIRINOX. Zur Ergänzung dieser Arbeit ist eine Analyse der gewonnenen RNA mittels RNA Sequenzierung geplant, welche noch detailliertere Einblicke in die Immunologie von Patienten mit PDAC ermöglichen wird.



## 6. Literaturverzeichnis

- Aglietta, M., et al. (2014). "A phase I dose escalation trial of tremelimumab (CP-675,206) in combination with gemcitabine in chemotherapy-naive patients with metastatic pancreatic cancer." Ann Oncol **25**(9): 1750-1755.
- Alexandrov, L. B., et al. (2013). "Signatures of mutational processes in human cancer." Nature **500**(7463): 415-421.
- Andrews, L. P., et al. (2017). "LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target." Immunol Rev **276**(1): 80-96.
- Baitsch, L., et al. (2012). "Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization." PLoS One **7**(2): e30852.
- Bensch, F., et al. (2017). "CTLA-4/CD80 pathway regulates T cell infiltration into pancreatic cancer." Cancer Immunol Immunother **66**(12): 1609-1617.
- Bian, B., et al. (2019). "Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma." Oncoimmunology **8**(4): e1561120.
- Borsig, L. (2018). "Selectins in cancer immunity." Glycobiology **28**(9): 648-655.
- Borsig, L., et al. (2002). "Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2193-2198.
- Burris, H. A., 3rd, et al. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-2413.
- Cebada, J., et al. (2020). "Bispecific anti-PD-1/LAG-3 antibodies for treatment of advanced or metastatic solid tumors: a patent evaluation of US2018326054." Expert Opin Ther Pat **30**(7): 487-494.
- Chang, C. F., et al. (2019). "Prognostic Factors for Advanced Pancreatic Cancer Treated with Gemcitabine Plus S-1: Retrospective Analysis and Development of a Prognostic Model." Cancers (Basel) **11**(1).
- Cheng, X., et al. (2018). "Combination Immunotherapy Approaches for Pancreatic Cancer Treatment." Can J Gastroenterol Hepatol **2018**: 6240467.
- Christenson, E. S., et al. (2020). "Current and emerging therapies for patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: a bright future." Lancet Oncol **21**(3): e135-e145.

- Ciardiello, D., et al. (2019). "Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy." Cancer Treat Rev **76**: 22-32.
- Connor, A. A., et al. (2017). "Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." JAMA Oncol **3**(6): 774-783.
- Conroy, T., et al. (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." N Engl J Med **364**(19): 1817-1825.
- D'Angelo, A., et al. (2019). "Tumour infiltrating lymphocytes and immune-related genes as predictors of outcome in pancreatic adenocarcinoma." PLoS One **14**(8): e0219566.
- Das, M., et al. (2017). "Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity." Immunol Rev **276**(1): 97-111.
- Diana, A., et al. (2016). "Prognostic value, localization and correlation of PD-1/PD-L1, CD8 and FOXP3 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncotarget **7**(27): 40992-41004.
- Du, W., et al. (2017). "TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action." Int J Mol Sci **18**(3).
- Duffy, A. G. and T. F. Greten (2014). "Immunological off-target effects of standard treatments in gastrointestinal cancers." Ann Oncol **25**(1): 24-32.
- Duffy, M. J., et al. (2010). "Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report." Ann Oncol **21**(3): 441-447.
- Dunn, G. P., et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-998.
- Eisenhauer, E. A., et al. (2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." Eur J Cancer **45**(2): 228-247.
- Farkona, S., et al. (2016). "Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?" BMC Med **14**.
- Farren, M. R., et al. (2016). "Systemic Immune Activity Predicts Overall Survival in Treatment-Naive Patients with Metastatic Pancreatic Cancer." Clin Cancer Res **22**(10): 2565-2574.
- Feig, C., et al. (2012). "The pancreas cancer microenvironment." Clin Cancer Res **18**(16): 4266-4276.
- Forster, R., et al. (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-371.

Freeman, G. J., et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.

Fukunaga, A., et al. (2004). "CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma." Pancreas **28**(1): e26-31.

Gao, X., et al. (2012). "TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression." PLoS One **7**(2): e30676.

Grage-Griebenow, E. (2014). "The fatal alliance of cancer and T cells: How pancreatic tumor cells gather immunosuppressive T cells." Oncoimmunology **3**: e29382.

Grage-Griebenow, E., et al. (2014). "L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression." Mol Oncol **8**(5): 982-997.

Gros, A., et al. (2016). "Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients." Nat Med **22**(4): 433-438.

Haas, M., et al. (2010). "Prognostic relevance of CA 19-9, CEA, CRP, and LDH kinetics in patients treated with palliative second-line therapy for advanced pancreatic cancer." Tumour Biol **31**(4): 351-357.

Hato, S. V., et al. (2014). "Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics." Clin Cancer Res **20**(11): 2831-2837.

Häuselmann, I. and L. Borsig (2014). "Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis." Front Oncol **4**: 28.

Hazra, A. and N. Gogtay (2017). "Biostatistics Series Module 9: Survival Analysis." Indian J Dermatol **62**(3): 251-257.

Hernberg, M., et al. (1996). "The CD4+/CD8+ ratio as a prognostic factor in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy." J Clin Oncol **14**(5): 1690-1696.

Hodi, F. S., et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.

Homma, Y., et al. (2014). "Changes in the immune cell population and cell proliferation in peripheral blood after gemcitabine-based chemotherapy for pancreatic cancer." Clin Transl Oncol **16**(3): 330-335.

Huang, P. W., et al. (2019). "Validation and application of a prognostic model for patients with advanced pancreatic cancer receiving palliative chemotherapy." Cancer Med **8**(12): 5554-5563.

Huard, B., et al. (1994). "Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes." Eur J Immunol **24**(12): 3216-3221.

Ikemoto, T., et al. (2006). "Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients." Pancreas **33**(4): 386-390.

Imaoka, H., et al. (2016). "Prognostic impact of carcinoembryonic antigen (CEA) on patients with metastatic pancreatic cancer: A retrospective cohort study." Pancreatology **16**(5): 859-864.

Ino, Y., et al. (2013). "Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer." Br J Cancer **108**(4): 914-923.

Ishida, Y., et al. (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." Embo j **11**(11): 3887-3895.

Ivetic, A. (2018). "A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour." Cell Tissue Res **371**(3): 437-453.

Jin, F. and F. Wang (2020). "The physiological and pathological roles and applications of sialyl Lewis x, a common carbohydrate ligand of the three selectins." Glycoconj J **37**(2): 277-291.

Josefowicz, S. Z., et al. (2012). "Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function." Annu Rev Immunol **30**: 531-564.

Kamath, S. D., et al. (2019). "Ipilimumab and Gemcitabine for Advanced Pancreatic Cancer: A Phase Ib Study." Oncologist.

Kohn, L. A., et al. (2012). "Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin." Nat Immunol **13**(10): 963-971.

Kunk, P. R., et al. (2016). "From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy." J Immunother Cancer **4**: 14.

Kurihara, T., et al. (2015). "Practical prognostic index for survival in patients with unresectable pancreatic cancer treated with gemcitabine or S-1." Hepatogastroenterology **62**(138): 478-484.

Limagne, E., et al. (2019). "Trifluridine/Tipiracil plus Oxaliplatin Improves PD-1 Blockade in Colorectal Cancer by Inducing Immunogenic Cell Death and Depleting Macrophages." Cancer Immunol Res **7**(12): 1958-1969.

Liu, C., et al. (2017). "Circulating regulatory T cell subsets predict overall survival of patients with unresectable pancreatic cancer." Int J Oncol **51**(2): 686-694.

- Liu, W. M., et al. (2010). "Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses." Br J Cancer **102**(1): 115-123.
- Loos, M., et al. (2008). "Surgical treatment of pancreatic cancer." Ann N Y Acad Sci **1138**: 169-180.
- Macedo, F. I., et al. (2019). "Survival Outcomes Associated With Clinical and Pathological Response Following Neoadjuvant FOLFIRINOX or Gemcitabine/Nab-Paclitaxel Chemotherapy in Resected Pancreatic Cancer." Ann Surg **270**(3): 400-413.
- McCoy, K. D. and G. Le Gros (1999). "The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses." Immunol Cell Biol **77**(1): 1-10
- McGuigan A., et al. (2018). " Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes." World J Gastroenterol **24**(43): 4846–4861
- Meng, Q., et al. (2017). "Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis." Onco Targets Ther **10**: 4591-4598.
- Moore, M. J., et al. (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." J Clin Oncol **25**(15): 1960-1966.
- Morizane, C., et al. (2011). "Construction and validation of a prognostic index for patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma." Pancreas **40**(3): 415-421.
- Muhonen, T., et al. (1994). "Decreasing CD4/CD8 ratio during prolonged four-drug chemotherapy plus interferon treatment for metastatic melanoma." J Immunother Emphasis Tumor Immunol **15**(1): 67-73.
- Nakata, B., et al. (2008). "Chemokine receptor CCR7 expression correlates with lymph node metastasis in pancreatic cancer." Oncology **74**(1-2): 69-75.
- O'Reilly, E. M., et al. (2019). "Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial." JAMA Oncol **5**(10): 1431-1438.
- Opzoomer, J. W., et al. (2019). "Cytotoxic Chemotherapy as an Immune Stimulus: A Molecular Perspective on Turning Up the Immunological Heat on Cancer." Front Immunol **10**: 1654.
- Papalex, E. and R. Satija (2018). "Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity." Nat Rev Immunol **18**(1): 35-45.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **12**(4): 252-264.

Peng, P. J., et al. (2017). "On the significance of Tim-3 expression in pancreatic cancer." Saudi J Biol Sci **24**(8): 1754-1757.

Qian, F., et al. (2001). "L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3976-3981.

Quante, A. S., et al. (2016). "Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030." Cancer Med **5**(9): 2649-2656.

Robert-Koch-Institut (2016). "Zentrum für Krebsregisterdaten - Pankreaskarzinom."

Roselli, M., et al. (2016). "The association of clinical outcome and peripheral T-cell subsets in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI plus bevacizumab therapy." Oncoimmunology **5**(7): e1188243.

Sahin, I. H., et al. (2017). "Immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma: an emerging entity?" Ann Oncol **28**(12): 2950-2961.

Sallusto, F., et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-763.

Sancho, D., et al. (2005). "CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation." Trends Immunol **26**(3): 136-140.

Sankawa, Y. (2014). "The immune system - how does anti-tumor immunity arise ?" Oncology research and treatment **37 Suppl 4**: 2-5.

Santos, J. M., et al. (2017). "Adenoviral production of interleukin-2 at the tumor site removes the need for systemic postconditioning in adoptive cell therapy." Int J Cancer **141**(7): 1458-1468.

Scheithauer, W., et al. (2019). "Patterns of care in metastatic pancreatic cancer: patient selection in clinical routine." Therap Adv Gastroenterol **12**: 1756284819877635.

Shen, T., et al. (2017). "Prognostic value of programmed cell death protein 1 expression on CD8+ T lymphocytes in pancreatic cancer." Sci Rep **7**(1): 7848.

Shrikhande, S. V., et al. (2007). "Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma." Ann Surg Oncol **14**(1): 118-127.

Spectrophotometers, T. B. N. "Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers."

St Hill, C. A. (2011). "Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 3233-3251.

Steinberg, W. (1990). "The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen." Am J Gastroenterol **85**(4): 350-355.

Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." J Clin Invest **117**(5): 1137-1146.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Tao, C. J., et al. (2016). "A prognostic model combining CD4/CD8 ratio and N stage predicts the risk of distant metastasis for patients with nasopharyngeal carcinoma treated by intensity modulated radiotherapy." Oncotarget **7**(29): 46653-46661.

Tempero, M. A., et al. (2017). "Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." J Natl Compr Canc Netw **15**(8): 1028-1061.

"The TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition." (2016). from <https://www.uicc.org/resources/tnm/publications-resources>.

Torphy, R. J., et al. (2018). "Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs." Ann Gastroenterol Surg **2**(4): 274-281.

Triebel, F., et al. (1990). "LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4." J Exp Med **171**(5): 1393-1405.

Ueno, M., et al. (2019). "A review of changes to and clinical implications of the eighth TNM classification of hepatobiliary and pancreatic cancers." Jpn J Clin Oncol **49**(12): 1073-1082.

Vesely, M. D., et al. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." Annu Rev Immunol **29**: 235-271.

Von Hoff, D. D., et al. (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." N Engl J Med **369**(18): 1691-1703.

Wang-Gillam, A., et al. (2013). "A phase I study of IMP321 and gemcitabine as the front-line therapy in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma." Invest New Drugs **31**(3): 707-713.

Wang, J., et al. (2015). "Immune Therapy in GI Malignancies: A Review." J Clin Oncol **33**(16): 1745-1753.

Wang, X., et al. (2017). "Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3(+)Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncogene **36**(21): 3048-3058.

Wang, Y., et al. (2018). "Association between Tim3 and Gal9 expression and gastric cancer prognosis." Oncol Rep **40**(4): 2115-2126.

Wartenberg, M., et al. (2015). "Accumulation of FOXP3+T-cells in the tumor microenvironment is associated with an epithelial-mesenchymal-transition-type tumor budding phenotype and is an independent prognostic factor in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncotarget **6**(6): 4190-4201.

Welsch, T., et al. (2018). "The "T" now Matters: The Eighth Edition of the Union for International Cancer Control Classification of Pancreatic Adenocarcinoma." Ann Surg **268**(2): e36-e37.

Wherry, E. J. and M. Kurachi (2015). "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion." Nat Rev Immunol **15**(8): 486-499.

Williet, N., et al. (2019). "Folfinirox versus gemcitabine/nab-paclitaxel as first-line therapy in patients with metastatic pancreatic cancer: a comparative propensity score study." Therap Adv Gastroenterol **12**: 1756284819878660.

Winograd, R., et al. (2015). "Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma." Cancer Immunol Res **3**(4): 399-411.

Yago, T. (2004). "Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear." J Cell Biol **166**(6): 913-923.

Yamamoto, T., et al. (2012). "Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer." Pancreas **41**(3): 409-415.

Yang, C., et al. (2017). "The metastasis status and tumor burden-associated CA125 level combined with the CD4/CD8 ratio predicts the prognosis of patients with advanced pancreatic cancer: A new scoring system." Eur J Surg Oncol **43**(11): 2112-2118.

Yang, J. C., et al. (2007). "Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis." J Immunother **30**(8): 825-830.

Zhao, B., et al. (2011). "The chemotactic interaction between CCL21 and its receptor, CCR7, facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis." J Hepatobiliary Pancreat Sci **18**(6): 821-828.

Zhu, J., et al. (2011). "Increased CD4(+) CD69(+) CD25(-) T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression." J Gastroenterol Hepatol **26**(10): 1519-1526.

Ziegler, S. F., et al. (1993). "Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens." Eur J Immunol **23**(7): 1643-1648.

Zu, G., et al. (2019). "Meta-analysis of the prognostic value of C-C chemokine receptor type 7 in patients with solid tumors." Cancer Manag Res **11**: 1881-1892.

## Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CCD	charged-coupled device
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD	cluster of differentiation
CD3	cluster of differentiation 3
CD3 <sup>+</sup>	CD3 positive T-Lymphozyten
CD4	cluster of differentiation 4
CD4 <sup>+</sup>	CD4 positive T-Lymphozyten
CD62L	cluster of differentiation 62L
CD69	cluster of differentiation 69
CD8	cluster of differentiation 8
CD8 <sup>+</sup>	CD8 positive T-Lymphozyten
CEA	Caricinoembryonales Antigen
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated molecule 4
ddH <sub>2</sub> O	doubly distilled water
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	deleted in pancreatic cancer 4
dsDNA	double-stranded DNA
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FBS	Fötale Bovines Serum
FOLFIRINOX	Folsäure, Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
FoxP3	forkhead box P3
GBW	Gehan Breslow Wilcoxon Test
Gem nab-Pac	Gemcitabin nab-Paclitaxel
HR	Hazard Ratio
ID	Identifikationsnummer
IL-10	Interleukin 10
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
KUM	Klinikum der Universität München
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LMU München	Ludwig-Maximilians-Universität München
NSCLC	non small cell lung cancer
OS	overall survival
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDGF	platelet derived growth factor
PFS	progression free survival
PRR	pattern recognition receptors
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
RNA	Ribonukleinsäure
ssDNA	single-stranded DNA
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TIL	Tumor-infiltrierende Leukozyten

TIM-3.....	T-cell immuoglobulin and mucin domain containing 3
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TNM .....	TNM Classification of Malignant Tumors
<i>Tregs</i> .....	regulatorische T-Zellen
UICC.....	Union for International Cancer Control

## Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn **Prof. Dr. Stefan Böck** für die Überlassung des Themas sowie die Organisation und Unterstützung bei der Akquise der Patienten aussprechen. Ich bin ihm dankbar für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe sowohl klinisch als auch experimentell arbeiten zu dürfen. Ich möchte ihm an dieser Stelle auch nochmals für die Hilfe bei der Erstellung der Publikation in *Clinical and Translational Oncology* sowie eines Vortrags für das Symposium der Med III in Herrsching 2018 und eines Posters für den ESMO Kongress 2018 in München danken. Des Weiteren danke ich ihm für die Möglichkeit an der onkologischen Autumn School der Deutschen Krebsgesellschaft 2017 teilnehmen zu dürfen.

Zudem möchte ich mich herzlichst bei Herrn **PD Dr. Stephan Kruger** für die große Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Studie, dem Erstellen der Publikation in *Clinical and Translational Oncology* sowie eines Posters für das Symposium der Med III in Herrsching 2018 und den ESMO Kongress 2018 danken. Ohne sein enormes Engagement und fachliches Wissen, die stete Beratung und die Hilfe bei Fragen aller Art wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich ihm für das stets freundschaftliche Miteinander danken.

In diesem Sinne möchte ich auch Herrn Dr. Deepak Bararia (ehemals aus dem Labor für Leukämie- und Lymphomforschung) sowie Frau Dr. Felicitas Rataj (ehemals aus dem Labor der klinischen Pharmakologie München) danken, die mich freundlich willkommen heißen haben und mich in der Durchführung dieser Studie unterstützt haben.

Ferner gilt mein Dank all den Kollegen aus der Medizinischen Klinik III, die bei der Patientenakquise geholfen haben sowie meinen Mitdoktoranden für das kollegiale Miteinander.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für die stete und liebevolle Unterstützung in den Jahren des Studiums und der Promotion danken.

## Veröffentlichungen

### Vollpublikation:

**2021**

Alterations in regulatory T cells and immune checkpoint molecules in pancreatic cancer patients receiving FOLFIRINOX or gemcitabine plus nab-paclitaxel.

*Sams L, Kruger S, Heinemann V, Bararia D, Haebe S, Alig S, Haas M, Zhang D, Westphalen CB, Ormanns S, Metzger P, Werner J, Weigert O, von Bergwelt-Baildon M, Rataj F, Kobold S, Boeck S.*

*Clin Transl Oncol.* 2021 Apr 19. doi: 10.1007/s12094-021-02620-x. Online ahead of print.

### Vorträge:

**2018**

Alterations in peripheral T cell Subsets, T cell Activation Markers and Immune Checkpoint Molecules in Advanced Pancreatic Cancer Patients Receiving FOLFIRINOX or Gemcitabine + nab-Paclitaxel

*Vortrag im Rahmen des wissenschaftlichen Symposiums der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des LMU Klinikums Großhadern in Herrsching 2018*

### Poster:

**2018**

Alterations in peripheral T cell Subsets, T cell Activation Markers and Immune Checkpoint Molecules in Advanced Pancreatic Cancer Patients Receiving FOLFIRINOX or Gemcitabine + nab-Paclitaxel

*Poster Präsentation im Rahmen des ESMO Kongress 2018 in München.*



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

Sams, Lauren Eleonore

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Molekulare Charakterisierung der immunologischen Veränderungen bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom unter einer palliativen Chemotherapie mit FOLFIRNOX oder Gemcitabin & nab-Paclitaxel**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.03.2022

Lauren E. Sams

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand