

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Immunologische Biomarker beim Pankreaskarzinom:
Lösliches *Programmed cell death protein 1* und löslicher
Programmed death ligand 1 im Serum von Patienten mit
fortgeschrittenem Pankreaskarzinom**

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

vorgelegt von
Marie-Louise Legenstein
aus
Wiener Neustadt
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Böck, MHBA

Mitberichterstatter: PD Dr. Georg Beyer

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD. Dr. Stephan Kruger

PD. Dr. Steffen Ormanns

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2023

**Gewidmet den Menschen mit Pankreaskarzinom
und ihren Familien**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Das Pankreaskarzinom	8
1.2	„Cancer immunoediting“	12
1.3	Immuncheckpoints	15
1.3.1	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4	15
1.3.2	Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2	16
1.3.2.1	Struktur und Expression von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2	16
1.3.2.2	Funktionelle Bedeutung von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2	17
1.3.2.3	Klinische Bedeutung von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1	18
1.3.2.4	Expression von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2 im Tumor	19
1.3.3	Lösliches Programmed cell death protein 1 und löslicher Programmed death ligand 1	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Datenbank und Patienten	23
2.2	Patientenfindung für sPD-1 und sPD-L1	24
2.3	Blutproben für sPD-1 und sPD-L1	24
2.4	Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1	25
2.5	Tumorproben und Immunhistochemie	26
2.6	Statistische Analyse	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Charakteristika der Datenbankpatienten	29
3.2	Patientencharakteristika der sPD-1 und sPD-L1 Stichprobe	33
3.3	Klinische Charakteristika der Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median	37
3.4	Einfluss der sPD-1 und sPD-L1 Werte auf das Gesamtüberleben mittels Cox Regression	48
3.5	CA 19-9 und CEA bei Patienten mit sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median	49
3.6	Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und den CRP Werten	54
3.7	Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Leukozytenzahl	57
3.8	Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Thrombozytenzahl	62

3.9	Korrelation zwischen den sPD-1 und sPD-L1 Werten bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom.....	65
3.10	Korrelation zwischen den sPD-L1 Serumwerten und der T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe beziehungsweise der PD-L1 Expression des Tumors.....	66
3.11	Korrelation zwischen der PD-L1 Expression im Tumorgewebe und dem Gesamtüberleben	72
4	Diskussion.....	74
4.1	Patientencharakteristika „Der informative Patient“ und der „sPD-1 und sPD-L1 Kohorte“	74
4.2	Prognostische Relevanz von sPD-1, sPD-L1 und PD-L1 im Tumorgewebe	75
4.3	Entstehung und Regulation von sPD-1 und sPD-L1 in Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom.....	78
4.4	CA 19-9 und CEA bei Patienten mit sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median	79
4.5	Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und den CRP Werten	80
4.6	Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Leukozytenzahl.....	81
4.7	Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Thrombozytenzahl	82
4.8	Korrelation zwischen den sPD-L1 Serumwerten und der T-Zell Infiltration beziehungsweise der PD-L1 Expression im Tumorgewebe.....	83
5	Zusammenfassung.....	85
6	Danksagung.....	87
7	Literaturverzeichnis	88
8	Abbildungsverzeichnis	95
9	Tabellenverzeichnis	97
10	Veröffentlichungen.....	98
11	Gender-Hinweis	99
12	Eidesstattliche Versicherung.....	100

Abkürzungsverzeichnis

BRCA2	<i>Breast cancer gene 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ECOG-Performance Status	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPF	<i>High power field</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
KI	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
MDCT	Multidetektor-Computertomographie

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid (RNA)</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PanIn	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed death ligand 2</i>
PFS	progressionsfreies Überleben
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
sPD-1	<i>Soluble programmed cell death protein 1</i>
sPD-L1	<i>Soluble programmed death ligand 1</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom hat eine fast ebenso hohe Neuerkrankungs- wie Sterblichkeitsrate und stellt somit eine der Tumorarten mit der höchsten Letalität dar [1]. Ein Langzeitüberleben ist immer noch eine Seltenheit. Die relative 5-Jahres Überlebenschance in Deutschland beträgt circa 10%, wobei hierbei schon initial kurativ behandelte Patienten mit deutlich besserer Prognose miteingerechnet sind. Männer und Frauen erkranken in etwa gleich häufig am Pankreaskarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter von Männern liegt bei etwa 72 Jahren, das der Frauen bei etwa 76 Jahren [2].

Patienten mit Pankreaskarzinom leiden meist erst im fortgeschrittenen Stadium unter Beschwerden. Die Symptome sind häufig unspezifisch. Deshalb wird das Pankreaskarzinom meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Zu den vorherrschenden Frühsymptomen gehören unter anderem Appetitlosigkeit, unspezifische Oberbauch- und Rückenschmerzen, Gewichtsverlust sowie ein Ikterus [3, 4].

Das Pankreas wird anatomisch in einen Kopfbereich (*Caput*), einen Pankreaskörper (*Corpus*) und den Pankreasschwanz (*Cauda*) unterteilt. Ein Karzinom des Pankreas findet sich in 70% der Fälle im Kopfbereich des Pankreas. Hier kommt es aufgrund des invasiven Wachstums oftmals zu einer Stenose des nahegelegenen Gallen- und Pankreasgangs mit einem daraus resultierenden Ikterus [5].

Als Risikofaktoren für die Entstehung einer Neubildung des exokrinen Pankreas zählen unter anderem Rauchen, langjähriger Diabetes mellitus, ein erhöhter *Body-Mass-Index* und eine chronische Pankreatitis [6-8]. In etwa 10% der Fälle lässt sich ein familiärer Hintergrund beim Pankreaskarzinom aufdecken, welcher das individuelle Risiko daran zu erkranken, maßgeblich erhöht. Einen der wichtigsten genetischen Risikofaktoren stellt dabei eine Mutation im *Breast cancer gene 2* (BRCA 2) dar. Diese erhöht auch das Risiko für die Entstehung eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms. Ein deutlich erhöhtes Risiko findet sich zudem bei Patienten mit Lynch Syndrom, Peutz-Jeghers Syndrom oder familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) [1, 8]. Auch die hereditäre Pankreatitis zählt zu einem wichtigen genetischen Risikofaktor. Nicht immer

lässt sich eine bestimmte Mutation als Ursache für die familiäre Häufung identifizieren [8].

Zu den Vorläuferläsionen des exokrinen Pankreaskarzinoms zählt die Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN). Hierbei handelt es sich um eine hyperplastische, nicht invasive Läsion des Pankreasgangsystems, die bereits eine Reihe an Genmutationen aufweist. Sie findet sich meist in Pankreasgängen, die kleiner als 5 mm sind. Man teilt die PanIN in drei Stadien ein, wobei das Stadium I noch in die Subtypen PanIN IA und PanIN IB unterteilt wird. Insbesondere die PanIN III Läsion gilt als eine Hochrisikoläsion [5, 9, 10]. Als zystische Vorläufer des Pankreaskarzinoms gelten die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös-zystische Neoplasie (MCN). Diese sollten bei Entdeckung engmaschig untersucht und je nach Wachstumsmuster gegebenenfalls reseziert werden [9, 11].

Adenokarzinome des Pankreas stellen mit 85-90% den häufigsten histologischen Subtyp dar [7]. Die duktaalen Adenokarzinome zeigen, mikroskopisch betrachtet, gangartige adenoide Strukturen, welche von desmoplastischem Stroma umgeben sind. Adenokarzinome des Pankreas wachsen in das peripankreatische Fettgewebe und weisen häufig eine perineurale Invasion auf [5]. Seltenerer Formen des Pankreaskarzinoms sind das Azinuszellkarzinom, das mit einer Häufigkeit von ca. 1-2% vertreten ist, und die neuroendokrine Neoplasie, die mit 1-2% ebenfalls einen seltenen Subtyp darstellt. Nach der histologischen Sicherung wird der Grad der Differenzierung bestimmt. Diese ist in drei Stufen eingeteilt: gut, mäßig und gering differenziert (G1-G3). Abbildung 1 zeigt ein mäßig differenziertes Pankreaskarzinom. Molekularpathologisch betrachtet, findet man eine Akkumulation von somatischen Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. In circa 90% der Fälle lässt sich eine KRAS Mutation beim Pankreaskarzinom nachweisen [1, 12].

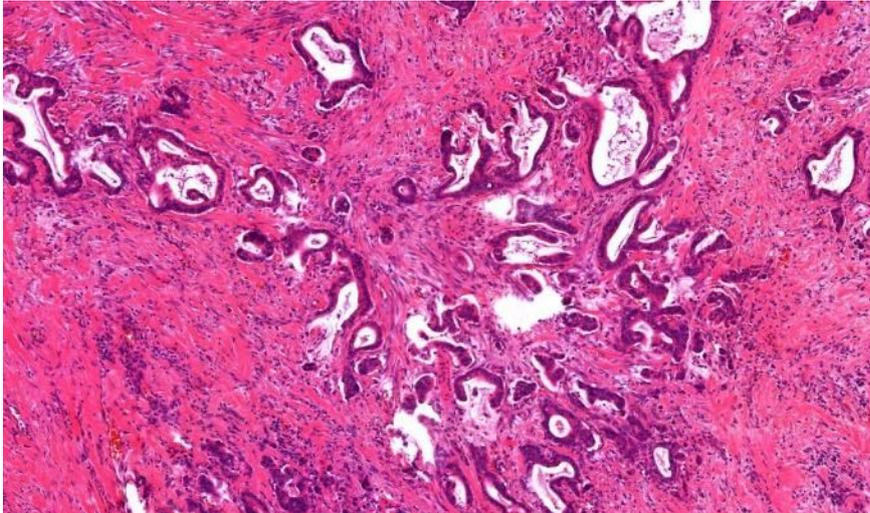


Abbildung 1: Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreas (G2), Quelle: Matthias Trummer

Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom sollte zunächst eine Schnittbildgebung erfolgen. Hierbei stehen verschiedene Schnittbildverfahren - beispielsweise die Multidetektor-Computertomographie (MDCT) - zur Verfügung. Mithilfe dieser Verfahren kann der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom erhärtet und sogleich eine Einschätzung der Resektabilität sowie eine Aussage über das Vorliegen von Metastasen getroffen werden. Zur genaueren Beurteilung der umgebenden Gefäße sollte die Untersuchung unter Zugabe von Kontrastmittel erfolgen [13]. Weitere verwendete bildgebende Verfahren sind unter anderem auch die transabdominelle Sonographie, die Endosonographie, die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) [1].

Bei einer primär resektablen Raumforderung des Pankreas, kann auf eine präoperative histologische Sicherung verzichtet werden. Vor Beginn einer palliativen Therapie ist eine histologische Sicherung aus dem Primarius oder der Metastase jedoch obligat [14]. Eine Möglichkeit der Tumorsicherung aus dem Pankreas stellt die Feinnadelaspiration in Rahmen einer Endosonographie dar [15].

Zum Diagnosezeitpunkt hat sich auch die Bestimmung des Tumormarkers Carbohydrat Antigen 19-9 (CA 19-9) bewährt. Mit seiner Hilfe können wichtige Aussagen bezüglich der individuellen Prognose getroffen werden. Auch eignet sich CA 19-9 als Verlaufsparmter [16]. So lässt sich beispielsweise ein besseres

Gesamtüberleben bei Patienten finden, welche eine operative Therapie erhielten, wenn der CA 19-9 Wert präoperativ bereits niedrig war, beziehungsweise postoperativ abfiel [17]. Auch ein fallender CA 19-9 Wert unter Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom lässt auf ein gutes Ansprechen schließen und ist ein prognostisch günstiges Zeichen [18, 19]. Als Screeningparameter ist CA 19-9 jedoch nicht geeignet. Die Sensitivität liegt nur bei 73-81%, die Spezifität bei 82-90% [17].

Mittels der oben genannten bildgebenden Verfahren wird eine Einteilung nach der TNM-Klassifikation und der UICC-Stadieneinteilung ermöglicht. Unter Zuhilfenahme dieser Einteilungen wird über das weitere therapeutische Vorgehen entschieden. Zu den derzeit möglichen Vorgehensweisen zählen - je nach Stadium - die operative Resektion des Tumors, die Radiotherapie und die Chemotherapie [1]. Bei schlechtem Allgemeinzustand oder ausgeprägten Komorbiditäten kann auch ein rein palliatives Therapiekonzept „*Best supportive care*“ zur Symptomkontrolle erfolgen [14].

Die chirurgische Resektion stellt derzeit die einzige Behandlungsmöglichkeit in kurativer Intention dar und ist mit einem signifikant längeren Überleben der Patienten assoziiert [1]. Ziel ist es, eine R0 Resektion durchzuführen [20]. Bei Befall des Pankreaskopfes wird in der Regel eine partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Erhalt des Pylorus durchgeführt. Bei Karzinomen des Pankreasschwanzes ist eine Pankreaslinksresektion die Operationsmethode der Wahl. In einzelnen Fällen kann bei größerer Ausdehnung des Pankreaskarzinoms eine totale Entfernung des Pankreas notwendig sein. Bei Befall des Pankreaskörpers wird eine subtotale Pankreaslinksresektion oder gegebenenfalls eine totale Duodenopankreatektomie empfohlen [14].

Die Ergebnisse der CONKO-001 Studie zeigen, dass ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben der Patienten möglich ist, wenn diese im Anschluss an die Operation eine adjuvante Chemotherapie erhalten [21]. Hierbei kann auf Gemcitabin zurückgegriffen werden. Bei fitteren Patienten kann auf Grundlage der PRODIGE-24-Studie auch eine modifizierte FOLFIRINOX Therapie (5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) in Erwägung gezogen werden [22, 23].

Liegt bereits ein fortgeschrittenes Stadium des Pankreaskarzinoms vor, wird in der Regel eine palliative Chemotherapie eingeleitet. Die passende Chemotherapie für die Patienten wird unter Berücksichtigung von Allgemeinzustand, Alter, Organfunktion sowie Komorbiditäten ausgewählt [14]. Hierbei wird das FOLFIRINOX-Regime oder eine Kombinationstherapie von Gemcitabin mit nab-Paclitaxel empfohlen, insofern die Patienten diese intensiven Chemotherapien tolerieren. Die kombinierte Gabe von Gemcitabin plus Erlotinib bleibt mittlerweile Einzelfällen vorbehalten. Ein Hautausschlag unter dieser Therapie ist hierbei prädiktiv für ein Therapieansprechen. Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand oder Komorbiditäten kann eine Monotherapie mit Gemcitabin angeboten werden [1, 24-26]. Die oben genannte Radiotherapie kann im Falle eines lokalen Rezidivs oder bei lokal fortgeschrittenen Tumoren angewandt werden. Sie kann auch bei einer Metastasierung, insbesondere bei Befall des Gehirns oder des Skeletts, als symptomkontrollierende Maßnahme durchgeführt werden [1, 14].

1.2 „Cancer immunoediting“

Die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen wird als *Cancer immunoediting* bezeichnet. Es werden dabei 3 Phasen unterschieden. Abbildung 2 gibt einen Überblick über diese 3 Phasen.

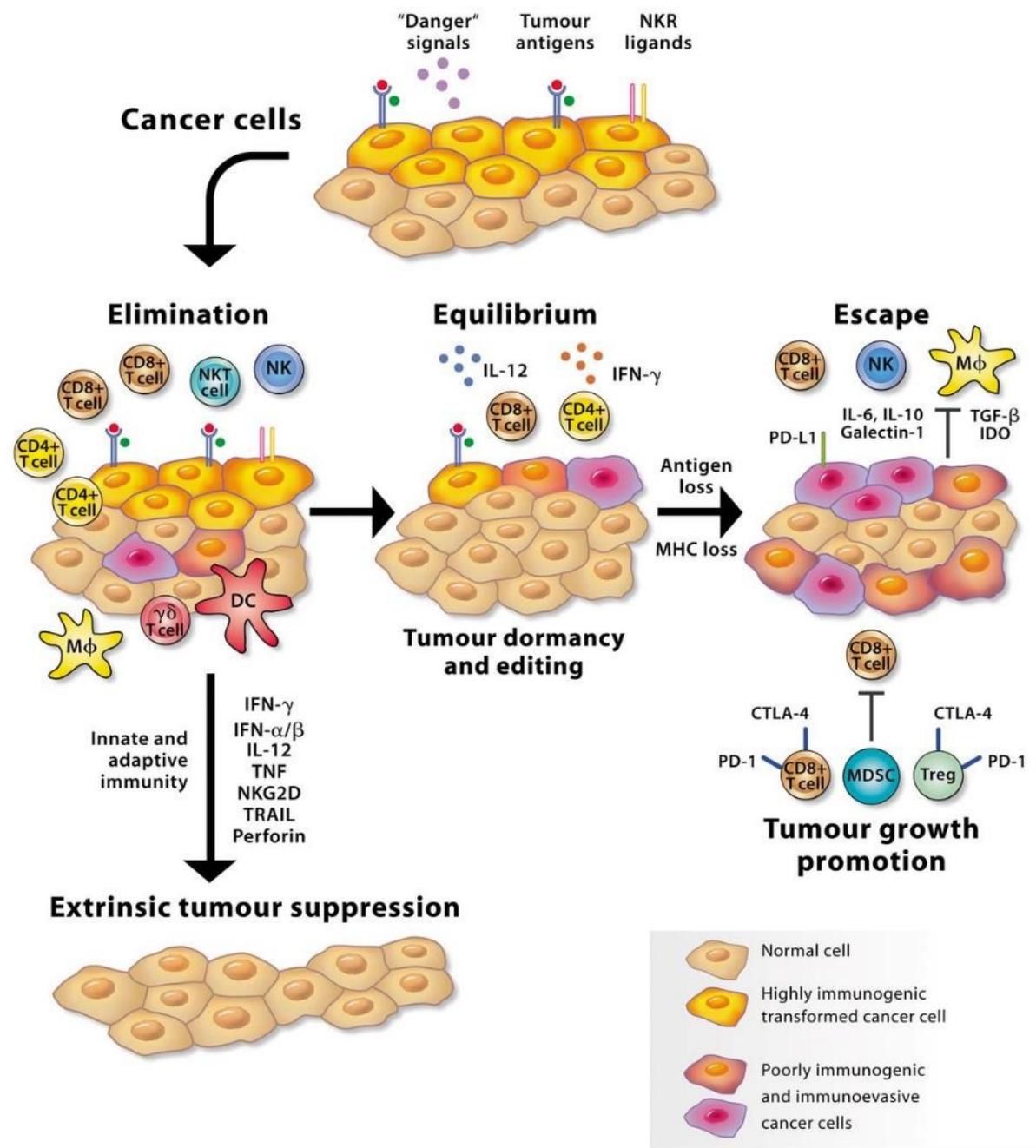


Abbildung 2: *Cancer immunoediting*, Quelle: Dempke et al. 2015 [27]

Die 1. Phase beschreibt die Eliminierung und Überwachung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Charakteristisch für diese Phase ist der Versuch, das Tumorzellwachstum bereits in seiner Anfangsphase einzudämmen und die vorhandenen Tumorzellen zu eliminieren. Bevor der Tumor jedoch von dem Immunsystem erkannt

wird, erreicht er eine bestimmte Größe, beginnt invasiv zu wachsen und erhält vermehrten Anschluss an das Blutsystem. Invasives Wachstum führt zu einer Entzündung im Körper, welche die Migration von Zellen des angeborenen Immunsystems - insbesondere natürliche Killerzellen, Makrophagen und dendritische Zellen - in den Tumor fördert. Diese initiale Antwort des Immunsystems geht mit der Produktion einer Reihe von Zytokinen einher und führt bereits zu einem partiellen Untergang der Tumorzellen sowie der Ausschüttung weiterer Chemokine, welche ihrerseits Immunzellen anlocken. Natürliche Killerzellen führen beispielsweise zu einem Perforin-, Fas-Ligand- und *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing Ligand*- (TRAIL) vermittelten Untergang der Tumorzelle mit nachfolgender Freisetzung von Tumorantigenen. Nun kommt das erworbene Immunsystem ins Spiel. Einen wichtigen Verbindungspunkt zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bilden dabei die dendritischen Zellen, welche die abgetöteten Tumorzellen phagozytieren und im Lymphknoten präsentieren. Mit Hilfe der T-Helfer-Zellen kommt es schließlich zur Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen. Diese zytotoxischen T-Zellen wandern in das Tumorgewebe ein und induzieren über sogenannte Todesliganden die Apoptose der Tumorzellen [28-30].

Die 2. Phase beschreibt die Gleichgewichtsphase (engl. *Equilibrium*). Diese Phase tritt ein, wenn es dem Immunsystem in der ersten Phase nicht gelungen ist, alle Tumorzellen zu eliminieren. Hierbei kommt es zur kontinuierlichen Zerstörung von Tumorzellen und in etwa gleichem Maße gelingt es dem Tumor, neue Tumorzellen zu produzieren. Diese neuen Tumorzellen beinhalten meist Mutationen, welche dem Tumor einen Selektionsvorteil verschaffen und den malignen Zellen die Möglichkeit bieten, dem Immunsystem zunächst zu entkommen. Andererseits können diese Mutationen auch die Expression von immunogenen Neoantigenen bedingen, welche durch das Immunsystem erkannt werden und so eine verstärkte Immunantwort hervorrufen. Ursachen eines gehäuften Auftretens von Mutationen sind insbesondere Mikrosatelliteninstabilität, die Instabilität der Nukleotidexzisionsreparatur und die chromosomale Instabilität. Die Gleichgewichtsphase kann einige Jahre anhalten [28-31].

Die 3. Phase beschreibt die *Escape* Phase. In diesem Stadium kommt es zu einer Größenzunahme des Tumors, welcher nun in einer immunsupprimierten Umgebung

wächst. Diese Umgebung kommt durch verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen zustande. Einerseits stellt die Regulation der Präsentation des *Major histocompatibility complex I* (MHC-I) der Tumorzelle eine Möglichkeit dar, um von den T-Zellen nicht als maligne erkannt zu werden, andererseits können die Tumorzellen auch bestimmte Liganden exprimieren, welche die T-Zellen daran hindern, sich an die Tumorzelle zu binden. Zudem können Tumorzellen auch eine Apoptose der T-Zellen induzieren. Somit ist es Tumorzellen möglich, lokal an Größe zuzunehmen und auch zu metastasieren. In dieser Phase tritt der Tumor dann auch klinisch in Erscheinung [28-30].

1.3 Immuncheckpoints

Immuncheckpoints sind Rezeptoren an der Oberfläche von T-Zellen. Beim Binden von Liganden an solche Rezeptoren, wird die Intensität der Immunantwort moduliert [32].

Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) und *Programmed cell death protein 1* (PD-1) sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und stellen eben solche *Immuncheckpoints* dar und können so die Immunantwort regulieren [33]. Beispielsweise kann beim Binden von PD-1 an seinen Liganden eine überschießende Immunantwort bei chronischen Virusinfektionen vermieden werden [34, 35]. Demzufolge sind CTLA-4 und PD-1 für eine Eindämmung der Immunantwort verantwortlich [33]. In den Kapiteln 1.3.1 und 1.3.2 inkludierend der Unterpunkte wird näher über deren Funktion und Aufbau eingegangen.

1.3.1 Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4

CTLA-4 ist fast ausschließlich auf CD4+ und CD8+ T-Zellen zu finden. Vereinfacht dargestellt kompetiert CTLA-4 mit CD28 um eine Bindung an CD80 und CD86. CD28 ist ein kostimulatorisches Signal, welches durch Interaktion mit CD80 oder CD86 zur Aktivierung der T-Zelle beiträgt. Die Richtung der Immunantwort im Sinne einer Herabregulierung oder Intensivierung hängt demnach unter anderem von dem Verhältnis von CD28 und CTLA-4 ab [33]. CTLA-4 Inhibitoren wie Ipilimumab zeigten bereits Therapieerfolge bei der Behandlung des NSCLC, dem malignem Melanom und

weiteren Tumorentitäten [36, 37]. Beim Pankreaskarzinom scheint eine alleinige Behandlung mit Ipilimumab allerdings nicht wirksam zu sein [38].

1.3.2 Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2

1.3.2.1 Struktur und Expression von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2

Programmed cell death protein 1 (PD-1) wurde erstmals 1992 von der Forschungsgruppe rund um Yasumasa Ishida und Tasuku Honjo beschrieben [39]. PD-1 besteht aus 288 Aminosäuren und ist ein Typ 1 Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, genauer der *B7/Cluster of differentiation* (CD8) Familie [40]. PD-1 wird von unreifen CD4- und CD8- Zellen während der Entwicklung des T-Zell-Rezeptors im Thymus exprimiert [41, 42]. Außerdem wird PD-1 von T-Zellen, NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen), B-Zellen, Monozyten und einigen dendritischen Zellen exprimiert [34, 35, 40]. Die Expression von PD-1 wird durch ein aktivierendes Signal über den T-Zell-Rezeptor induziert. PD-1 wird insbesondere bei anhaltender Antigen-Stimulation verstärkt exprimiert, wobei dies sowohl für die Stimulation durch Fremd- als auch Autoantigene zutrifft. PD-1 ist auch ein Marker für erschöpfte, nicht funktionsfähigen T-Zellen, wie sie im Tumormikromilieu häufig anzutreffen sind [41, 43, 44].

PD-1 bindet an *Programmed death ligand 1* (PD-L1) und *Programmed death ligand 2* (PD-L2). PD-L1 wird von T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Durch das Vorkommen von PD-1 und PD-L1 auf diesen Zellen sind bidirektionale Interaktionen zwischen den Immunzellen möglich [41]. PD-L1 ist allerdings auch auf anderen nicht hämatopoetischen Zellen zu finden. Hierzu zählen Zellen des Herzens, des Skelettmuskels, der Plazenta, der Lunge, der Niere, der Leber, des Nervensystems und den Inselzellen des Pankreas. Darüber hinaus findet man PD-L1 auf der Zelloberfläche maligner Tumorzellen. Dies stellt einen wichtigen *Immunescape*-Mechanismus maligner Tumore dar [35, 41].

Eine PD-L2 Expression wurde ursprünglich für Antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen, beschrieben. Untersuchungen der letzten

Jahre zeigten, dass eine PD-L2 Expression auch auf Nicht-Immunzellen, insbesondere auf malignen Tumorzellen, vorhanden sein kann [35]. Die Expression von PD-L1 und PD-L2 wird stark von der inflammatorischen Umgebung beeinflusst [41].

1.3.2.2 Funktionelle Bedeutung von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2

Eine naive T-Zelle braucht zwei Signale, um aktiviert zu werden. Das erste Signal wird über den T-Zellrezeptor vermittelt. Über den T-Zellrezeptor können T-Zellen ein Antigen erkennen, welches gebunden an den *Major histocompatibility complex* (MHC) auf der Oberfläche von Zellen präsentiert wird. Das zweite Signal wird über sogenannte kostimulatorische Moleküle vermittelt. Der MHC wird in verschiedene Subgruppen unterteilt. Für die T-Zellaktivierung sind der MHC-I, welcher auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird, und der MHC-II, welcher auf der Oberfläche von speziellen antigenpräsentierenden Zellen zu finden ist, ausschlaggebend. CD8+ T-Zellen können mittels ihres T-Zellrezeptors an den passenden Antigen-MHC-I-Komplex binden und in Anwesenheit von aktivierenden, kostimulatorischen Signalen eine Apoptose der präsentierenden Zelle induzieren. Neben kostimulatorischen Signalen, die eine Apoptose begünstigen, können auch inhibierende Signale vorhanden sein, welche dazu führen, dass keine Immunantwort hervorgerufen wird [45, 46].

So führt die Bindung des PD-1 Rezeptors an PD-L1 oder PD-L2 zu einer Minderung der T-Zell Proliferation, der Zytokinproduktion, der zytolytischen Funktion und zu einer Beeinträchtigung des Überlebens der entsprechenden T-Zelle [41, 47]. Das Ausmaß der PD-1 vermittelten Inhibition hängt von der vermittelten Signalstärke des T-Zell-Rezeptors ab. Hierbei führt ein schwaches T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal zu einer stärkeren Wirkung des PD-1 Signalwegs. PD-1 kann die T-Zell Funktion und das T-Zell Überleben unter anderem direkt über die Blockade von aktivierenden Signalen beeinträchtigen (Abbildung 3) [41]. Außerdem fördert die PD-1/PD-L1-Interaktion die Ausdifferenzierung von regulatorischen T-Zellen [41]. Wie bereits erwähnt hat PD-1 eine inhibitorische Funktion, welche physiologisch zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen wichtig ist. Dies erklärt, warum PD-1 auch

in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen scheint [34, 35, 40].

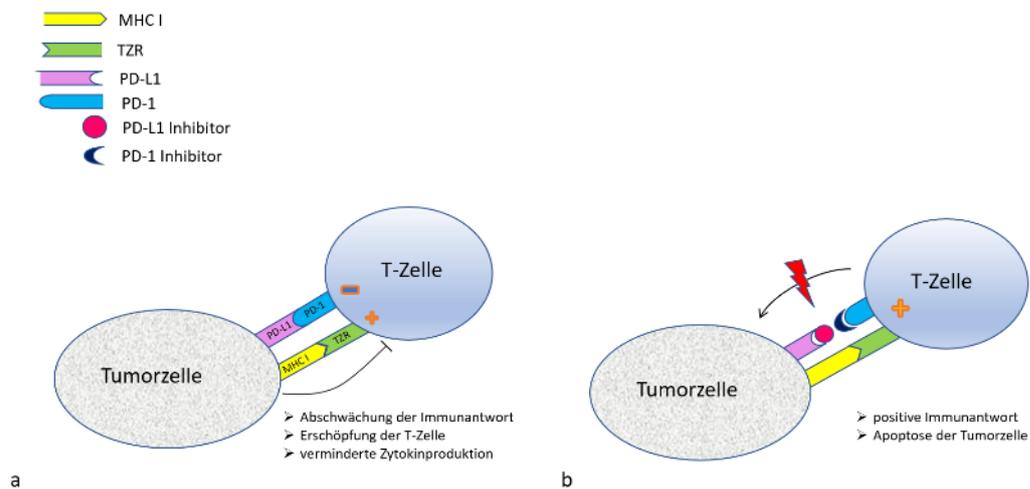


Abbildung 3: Interaktion zwischen einer Tumorzelle und einer T-Zelle

a) Durch die Bindung des MHC I an den TZR erhält die T-Zelle ein aktivierendes Signal. Dieses wird jedoch durch die gleichzeitige Bindung von PD-L1 an PD-1 abgeschwächt beziehungsweise unterdrückt.

b) Hier wird die Bindung von PD-L1 an PD-1 durch selektive PD-1 und PD-L1 Inhibitoren unterbunden. Folglich findet eine Immunantwort der T-Zelle statt.

MHC I = *Major histocompatibility complex I*, TZR = T-Zell Rezeptor, PD-1 = *Programmed cell death protein 1*, PD-L1 = *Programmed death ligand 1*

1.3.2.3 Klinische Bedeutung von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1

Für eine Vielzahl an Tumorerkrankungen konnte bereits die Wirksamkeit von PD-1 oder PD-L1 Inhibitoren (beispielsweise Nivolumab, Pembrolizumab oder Atezolizumab) gezeigt werden (siehe auch Abbildung 3). Je nach Tumorentität und spezifischer Tumorcharakteristika werden PD-1 und PD-L1 Inhibitoren dabei sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit Chemotherapie oder gemeinsam mit CTLA-4 Inhibitoren verwendet. Regelmäßig zum Einsatz kommen diese Medikamente

unter anderem beim metastasierten malignen Melanom, beim fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom (NSCLC), beim Nierenzellkarzinom, beim Urothelkarzinom, beim Hodgkin-Lymphom und - unabhängig vom Primärtumor - beim Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität im Tumorgewebe solider Tumoren [34, 48].

Beim Pankreaskarzinom haben bisweilen Therapien mit einem PD-1-, PD-L1- oder CTLA-4-*Immunecheckpoint*inhibitor zu keinem Erfolg geführt [49, 50]. Auch die kleine Gruppe an Patienten, welche einen Defekt der *Mismatch*-Reperaturgene aufweist, scheint möglicherweise nur eingeschränkt von solch einer Therapie zu profitieren [51, 52]. Ursächlich dafür könnte das ausgeprägte desmoplastische Stroma des Pankreaskarzinoms sein. Das desmoplastische Stroma besteht aus extrazellulärer Matrix, Pankreas-Sternzellen, Entzündungszellen, Blut- und Lymphgefäßen [53, 54]. Es führt zu einer erschwerten Infiltration von T- Zellen in das Tumorgewebe [55]. Eine erhöhte Dichte von Effektor (CD8+) und Helfer (CD4+) T-Zellen führt prinzipiell zu einer günstigeren Prognose. Das Pankreaskarzinom weist verglichen zu anderen Tumoren eine eher geringe T-Zell Infiltration auf [56].

1.3.2.4 Expression von Programmed cell death protein 1 und Programmed death ligand 1 und 2 im Tumor

PD-L1 wird auf der Zelloberfläche einer Vielzahl von soliden Tumoren exprimiert. Hierzu zählen neben dem Pankreas unter anderem das maligne Melanom, Karzinome der Lungen und des Gastrointestinaltrakts wie beispielsweise das Ösophaguskarzinom, das kolorektale Karzinom und das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Auch bei Karzinomen des Urogenitaltrakts ist eine PD-L1 Expression nachzuweisen [34]. Die Studienlage bezüglich der prognostischen Aussagekraft der PD-L1 Expression bei den verschiedenen Tumorentitäten ist heterogen. So haben Studien beim NSCLC gezeigt, dass das Ausmaß der PD-L1 Expression im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert [34, 57, 58]. Andere Studien zum NSCLC wiederum zeigten eine positive Korrelation zwischen der PD-L1 Expression und einem besseren klinischen *Outcome* für den Patienten [34, 59, 60]. Beim Magenkarzinom scheint eine positive PD-L1 Expression einen unabhängigen prognostischen Faktor für ein schlechteres *Outcome* für den Patienten darzustellen [34].

Die PD-L1 Expression im Tumorgewebe kann auch einen prädiktiven Marker für das Ansprechen auf einen PD-1 Inhibitor darstellen. Dies konnte beim NSCLC nachgewiesen werden [61]. Auch beim Harnblasenkarzinom konnten Powels et al. feststellen, dass Patienten, die eine hohe PD-L1 Expression aufwiesen, zu einem größeren Prozentsatz auf eine Therapie mit Atezolizumab, einem PD-L1 Antagonisten, ansprachen, als jene, die vor Therapiebeginn mit Atezolizumab keine oder eine nur sehr geringe PD-L1 Expression aufwiesen [34, 62].

1.3.3 Lösliches Programmed cell death protein 1 und löslicher Programmed death ligand 1

Kostimulatorische Moleküle kommen in der Regel membrangebunden auf der Oberfläche unterschiedlicher Zellen vor. Für die meisten kostimulatorischen Moleküle ist auch eine lösliche Form im Blut beschrieben. Im Allgemeinen entstehen die löslichen Formen von membrangebundenen Proteinen entweder durch proteolytische Abspaltung der membrangebundenen Form oder als Translationsprodukt einer alternativ gespleißten *Messenger Ribonucleic acid* (mRNA) [63].

Soluble PD-L1 (sPD-L1) kann *in vitro* im Überstand von PD-L1 positiven Zellen detektiert werden. In Zellkulturen von Zellen ohne membranständiges PD-L1 ist sPD-L1 jedoch nicht nachweisbar [64]. Demnach ist davon auszugehen, dass vor allem membrangebundenes PD-L1 den Ursprung von sPD-L1 darstellt [63]. Bei sPD-1 ist davon auszugehen, dass der Ursprung hier eher auf alternativ gespleißte mRNA zurückzuführen ist [65]. Entsprechend der Expression von PD-1 und PD-L1 werden auch die löslichen Formen von Immunzellen und Tumorzellen produziert. Frigola et al. fanden Hinweise darauf, dass unter den Immunzellen überwiegend die Zellen der myeloiden Zellreihe sPD-L1 produzieren [66].

Die genaue Funktion von sPD-1 und sPD-L1 ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Theorie für sPD-1 besagt, dass sPD-1 eine Bindung mit membrangebundenem PD-L1 und membrangebundenem PD-L2 eingehen könnte und damit eine Bindung von membrangebundenem PD-1 an einen membrangebundenen Liganden verhindert und so die daraus folgende Hemmung der T-Zelle unterbindet [63, 64].

Nach momentanem Kenntnisstand ist noch völlig unklar ob sich sPD-1 oder sPD-L1 als Prädiktor für ein Ansprechen auf eine Therapie mit *Checkpointinhibitoren* bei malignen Tumorerkrankungen eignen [67].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Immun*checkpoint*blockade von PD-1 und PD-L1 gewinnt weiterhin rasant an Bedeutung in der Onkologie. Für eine Vielzahl an Tumorerkrankungen sind PD-1 und PD-L1 Inhibitoren mittlerweile in Mono- und Kombinationstherapie zugelassen [48, 61]. Während die Bestimmung von PD-L1 im Tumorgewebe schon länger auch in der Routineversorgung zur Therapiestratifikation bei verschiedenen Tumorentitäten verwendet wird, liegen bislang nur wenige Daten zur Entstehung, Regulation und immunologischen Funktion der löslichen Formen von PD-1 und PD-L1 bei Tumorerkrankungen vor [34, 48, 61]. Zielsetzung dieser Arbeit war es, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Sind sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom nachzuweisen?
2. Wie entstehen sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom?
3. Wie werden sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom reguliert?
4. Kann anhand der Höhe der sPD-1 und sPD-L1 Werte eine Aussage über die Prognose von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom getroffen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Datenbank und Patienten

Seit 2011 werden Patientendaten, Blutproben und Tumorproben im Rahmen des translationalen Forschungsprojekts „Der informative Patient“ am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) prospektiv gesammelt. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden im *Comprehensive Cancer Center* am LMU-Klinikum, Campus Großhadern behandelt oder stellten sich zu einer Zweitmeinung vor. Als Einschlusskriterium musste ein exokrines Pankreaskarzinom histologisch gesichert worden sein. Bis August 2018 (*Data-lock*) wurden Daten zu 206 Patienten mit einem exokrinen Pankreaskarzinom gesammelt und es wurden regelmäßige *Follow-ups* durchgeführt. Der klinische Verlauf wurde bei allen Patienten retrospektiv erfasst.

Folgende Charakteristika wurden bei allen Patienten erfasst:

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beziehungsweise vor Therapiebeginn wurden folgende Parameter gesammelt: das Geschlecht, das Geburtsdatum, die Körpergröße, das Gewicht, die Lokalisation des Tumors, die histologische Klassifizierung mit Graduierung, die TNM-Stadieneinteilung und die Lokalisation der Metastasen, das Stadium (resektabel, lokal fortgeschritten oder metastasiert), der *Performancestatus* nach Karnofsky und der *ECOG-Performancestatus* (*Eastern cooperative oncology group-performance status*), die Erfassung eines vorliegenden Diabetes, die regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), sowie die Laborparameter Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Gesamtbilirubin, C-reaktives Protein (CRP), LDH, Hämoglobin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl.

Kontinuierlich erfasst wurden folgende Parameter: Informationen zu den Therapien, wie Operation in kurativer Intention und postoperativer Resektionsstatus, die Art, die Therapiedauer und die Anzahl der Zyklen von neoadjuvanter, adjuvanter und palliativen Therapien bis hin zur Drittlinientherapie, Datum und Lokalisation eines Rezidivs, Datum des Progresses, sowie gegebenenfalls das Todesdatum.

Die Feststellung des Progresses erfolgte anhand der RECIST-Kriterien (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*). Wenn dies nicht möglich war, also der Patient

beispielsweise aufgrund schlechter Laborparameter keine Therapie mehr bekommen konnte, wurde dies ebenfalls als (klinischer) Progress gewertet. Die Datenbankerstellung erfolgte mit *Microsoft Excel*.

2.2 Patientenfindung für sPD-1 und sPD-L1

Die Datenerfassung der Patienten erfolgte im Rahmen des Forschungsprojekts „Der informative Patient“.

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, um Teil der Kohorte zu werden, bei der eine Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1 stattgefunden hat

- Der Patient ist Teil des Patientenkollektivs „Der informative Patient“. Hier sind Patienten eingeschlossen, welche ihre Einwilligung in die Verarbeitung von Patientendaten und - falls vorhanden - Blutproben sowie Tumorproben gegeben haben.
- Bei dem Patienten liegt ein fortgeschrittenes Karzinom des exokrinen Pankreas vor. Diesbezüglich wurden eine Metastasierung bei Erstdiagnose beziehungsweise ein fortgeschrittener Lokalbefund des Tumors im Sinne einer Inoperabilität bei Erstdiagnose festgelegt.
- Die Diagnose des Pankreaskarzinoms sollte bis April 2015 gestellt worden sein, damit ein ausreichend langer Beobachtungszeitraum vorliegt.
- Es wurde eine Blutprobe vor Beginn der palliativen Chemotherapie asserviert.

2.3 Blutproben für sPD-1 und sPD-L1

Die Blutentnahmen erfolgten vor Beginn der palliativen Therapie. Die Serum-Röhrchen wurden mit venösem Blut der Patienten gefüllt. Um die Blutzellen zu entfernen, wurden die Röhrchen 10 Minuten lang mit 3000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Serumproben bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1

Die Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1 wurden am Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie an der Universität Bonn (unter der Leitung von Prof. Dr. med. Stefan Holdenrieder) durchgeführt.

sPD-1 und sPD-L1 wurden mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) bestimmt. Hierzu wurden die humanen PD-1 Antikörper-*Duosets* für ELISA (für PD-1 Katalognummer DY1086, für PD-L1/B7-H1 DY156) von *R&D Systems* (Minneapolis, MN) verwendet. Die Antikörper wurden auf der MSD *Mesoscale Quickplex SQ120* Plattform (MSD *Mesoscale Diagnostics*, Rockville, ML) angewandt, welche eine hoch sensitive chemilumineszente Detektion von PD-1 und PD-L1 ermöglicht.

Die Antikörper-*Duosets* beinhalteten Streptavidin- und Biotin-basierte *Capture-* und *Detection-*Antikörper sowie das dazu passende Standardmaterial für PD-1 und PD-L1.

Die *high-bind* Mikrotiterplatten von MSD wurden mit 25µL pro Well *Capture-*Antikörpern (Konzentration 2 µg pro ml für PD-1 und PD-L1) beimpft, versiegelt und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen (3 x 200µL pro Well PBS (*Phosphate-buffered saline*) mit 0,05% Tween). Anschließend wurden 150 µL pro Well BSA (*Bovine serum albumine*) (5% in PBS) als Blockierungslösung hinzugefügt, die Platte wurde verschlossen und bei 700 Umdrehungen pro Minute für eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift (3x 200µL pro Well PBS-T) wurden 25µl Standardmaterial beziehungsweise Patientenproben hinzugefügt. Nach erneuter Versiegelung erfolgte anschließend die Inkubation für 2 Stunden auf der Rüttelplatte.

Die Kalibrierungskurve wurde mittels standardisierter Proben in einer 1:4 Verdünnung mit einem PD-1 oder PD-L1-Gehalt von 30ng pro ml bis 7pg pro ml erstellt. Nach einem weiteren Waschdurchgang (3x200µL pro Well PBS-T) wurden 25 µL *Detection-*Antikörper pro Well hinzugefügt (Konzentrationen: 200ng pro ml für PD-1 und 100ng pro ml für PD-L1). Anschließend wurde erneut für 2 Stunden auf einer Rüttelplatte inkubiert.

Ein erneuter Waschschrift (3x200µL pro Waschung PBS-T) wurde durchgeführt und 25µL Streptavidin-sulfo-*tag* Antikörper pro Well hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert.

Nach einem zusätzlichen Waschvorgang (3x200µL pro Well PBS-T) wurden 150µL *Reading*-Puffer pro Well hinzugefügt. Danach konnte die chemilumineszente Messung auf der SQ120 QuickPlex durchgeführt werden. Die absolute Konzentration von sPD-1 und sPD-L1 (in ng pro ml) der Patientenproben konnte so mittels Kalibrierkurve berechnet werden.

Vor der klinischen Testung erfolgte eine Optimierung der Assays bezüglich der Plattenauswahl (*high-bind* Mikrotiterplatte oder Standard Mikrotiterplatte), Puffer- und Antikörperkonzentrationen (mittels Titration verschiedener Kombinationen) und Streptavidin-*Labeling*.

Mithilfe des Signal-Rausch-Verhältnisses von einigen Standardkonzentrationen konnten die besten Antikörperkonzentrationen ausfindig gemacht werden. Zusätzlich wurden Intra- und Inter-Assay-Präzision gesichert und die Linearität der Verdünnung bestätigt [68, 69].

2.5 Tumorproben und Immunhistochemie

Vor Beginn der palliativen Chemotherapie wurden Tumorproben zur Diagnosesicherung entnommen. Die Tumorproben wurden nach der Entnahme in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Diese wurden im Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität beziehungsweise von externen Pathologischen Instituten gelagert. Nach Identifikation und Anforderung der entsprechenden Tumorproben wurden sogenannte *Tissue microarrays* (TMA) angefertigt. Diese bestehen jeweils aus Tumorproben von 8 Patienten, wobei pro Patienten je drei 1 mm große Stanzzyylinder aus unterschiedlichen Tumorregionen entnommen und in einem gemeinsamen Paraffinblock eingebettet wurden (Abbildung 4). Im Anschluss wurden diese Paraffinblöcke geschnitten und auf einen Objektträger aus Glas aufgezogen. Um die CD3+ Lymphozyteninfiltration und PD-L1 Expression des Tumors zu bestimmen wurden die Leerschnitte anschließend mittels immunhistochemischer Färbemethoden behandelt. Hierzu wurde ein *Ventana Benchmark Ultra Autostainer* verwendet (*Ventana, Tucson, AZ, USA*).

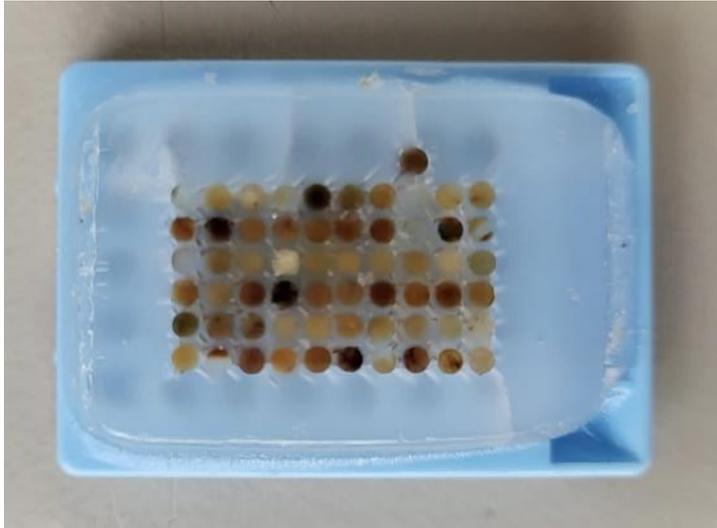


Abbildung 4: Exemplarisches Bild eines *Tissue microarrays*, Quelle: Matthias Trummer

Nach einem Schritt zur Entfernung des Wachses, konnte durch eine 64-minütige Anwendung der *Ventana Retrieval Lösung CC1* (pH 8,4, *Ventana*) die Antigenstruktur wiederhergestellt werden. Anschließend wurden die Proben mit dem monoklonalen Kaninchen-anti-PD-L1 Antikörper (1:100 Verdünnung, *clone E1L3N*, *Cell signaling technology*, *Danvers, MA, USA*) für 32 Minuten inkubiert. Nach der zweiten Antikörper Inkubation (*UltraView DAB Kit*; *Ventana*) konnte die Färbung mit einem diaminobenzidin-basierenden System von *Ventana* sichtbar gemacht werden. Der Vorgang wurde mittels eines anderen kommerziell erhältlichen *PD-L1 Kits* von *Ventana* validiert.

Die *Slides* wurden danach mit dem vorverdünnten monoklonalen Kaninchen-anti-PD-L1 Antikörper (*clone SP263*, *Konzentration 1,61 µg/ml*, *Ventana*) inkubiert und die Färbungen wieder mithilfe des diaminobenzidin-basierenden Systems nach der zweiten Inkubation dargestellt (*OptiView DAB Kit*; *Ventana*). Als Positivprobe wurde die menschliche Tonsille gewählt und als Negativprobe die menschliche Leber (Abbildung 5). Diese Kontrollen wurden bei jeder Färbung mitgefärbt. Als positiv wurde nur die membranöse PD-L1 Färbung der Tumorzellen gewertet. Anschließend wurde der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen in den Tumorproben ermittelt. Bei manchen Proben trat auch eine leichte Färbung des Zytoplasmas auf, welches als Artefakt gewertet wurde und somit nicht in die Berechnungen miteinflusst. Die Menge der CD3+ Lymphozyten Infiltration wurde semiquantitativ erhoben. Hierbei wurden

unter dem Mikroskop sogenannte *High power fields* (HPF) ausfindig gemacht und mit einer 200-fachen Vergrößerung untersucht. Im Zuge dieser Forschungsarbeit wurde eine sehr geringe Ausprägung der CD3+ Lymphozyten als *Score 0* definiert (0-5 CD3+ Zellen pro HPF). *Score 1* beinhaltet eine Anzahl von bis zu 50 CD3+ Zellen pro HPF. Wenn in einem HPF mehr als 50 CD3+ Lymphozyten zu finden waren, wurden diese als *Score 2* festgelegt. Es wurde nur die echte Tumordinfiltration von CD3+ Zellen gezählt. Zufällig anliegende Lymphfollikel oder Lymphozytenaggregate, welche eine hohe Anzahl an CD3+ Zellen aufweisen, flossen nicht in die Zählung mit ein.

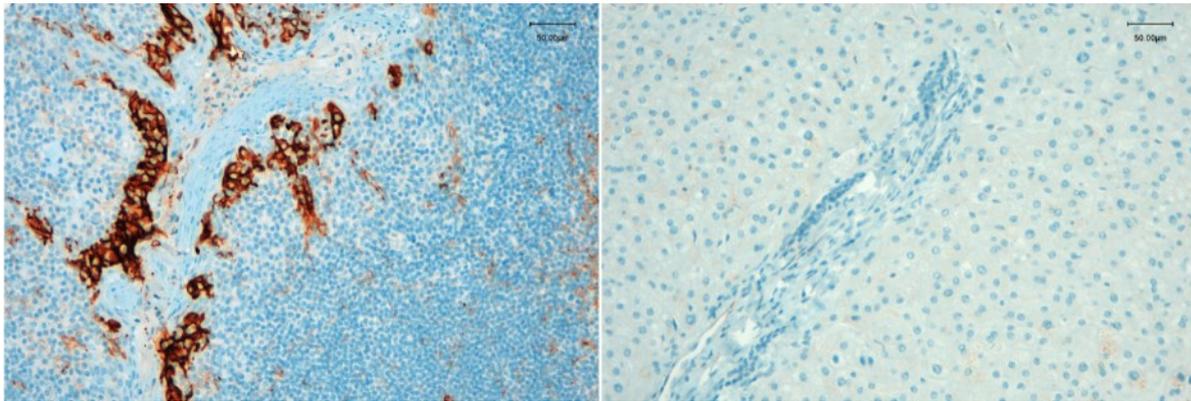


Abbildung 5: Immunhistochemische PD-L1 Färbung der Positiv- und Negativkontrolle

links: Histologische Aufarbeitung der Tonsille mit positiver PD-L1 Expression (Positivkontrolle)

rechts: Histologische Aufarbeitung der Leber mit fehlender PD-L1 Expression (Negativkontrolle)

2.6 Statistische Analyse

Erste statistische Analysen zur Selektion der Patientengruppe für die Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1 wurden mithilfe *Microsoft Excel 2011* durchgeführt. Die weiteren statistischen Analysen wurden unter Verwendung von *IBM SPSS Statistics (Version 25)* und *GraphPad Prism* durchgeführt. Mittels der Cox Regression wurde der Einfluss verschiedener Variablen auf das Gesamtüberleben geschätzt. Mit der Kaplan-Meier-Methode wurden sowohl die progressionsfreie Überlebensrate als auch das Gesamtüberleben geschätzt. Des Weiteren wurden Korrelationsanalysen nach Pearson und Spearman durchgeführt. Der Vergleich von Mittelwerten wurde mithilfe des t-Tests und der Vergleich der Varianzen mittels F-Tests berechnet. Die graphische Darstellung der Analysen erfolgte mit den Programmen *Microsoft Excel*, *IBM SPSS Statistics (Version 25)* und *GraphPad Prism*.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Datenbankpatienten

Insgesamt umfasste die Datenbank der Studie „Der informative Patient“ zum Zeitpunkt des *Data-Locks* im September 2018 206 Patienten. Hiervon waren 51,5% männlich und 48,5% weiblich. Das mediane Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt lag bei 65,5 Jahren. Der jüngste Patient war 29 Jahre und der älteste 84 Jahre. Einen Überblick über die klinischen Charakteristika der Patienten gibt die Tabelle 3.1.1.

Bei dem größten Anteil der Patienten wurde ein Adenokarzinom (96,4%) diagnostiziert. In 2,4% der Fälle lag ein Azinuszellkarzinom vor. Bei 2 Patienten konnte bei der diagnostischen Aufarbeitung des Karzinommaterials keine eindeutige histologische Zuordnung getroffen werden. Der Pankreaskopf war in mehr als der Hälfte der Fälle die primäre Tumorlokalisation. Der Pankreaskörper und Pankreasschwanz waren in Summe seltener vertreten (35,9%). Der häufigste Differenzierungsgrad war G3 und somit waren die Tumoren bei der Patientenkohorte insgesamt eher schlecht differenziert (G3+G4 = 62,2%). Zum Diagnosezeitpunkt konnte bei 38,8% der Patienten eine Operation in kurativer Intention durchgeführt werden. Die restlichen Patienten wurden in einem bereits fortgeschrittenen Erkrankungsstadium diagnostiziert. Hierbei lag bei 46,1% Patienten eine Fernmetastasierung vor und bei 15,0% der Erkrankten war der Tumor lokal fortgeschritten. Ein Überblick über die Lokalisation der Metastasen zu Beginn der palliativen Therapie gibt die Abbildung 6.

Alter in Jahren (Median, Range)	65,5 [29-84]	
Geschlecht		
männlich	106	51,5%
weiblich	100	48,5%
Tumorstadium bei Erstdiagnose		
resektabel	80	38,8%
metastasiert	95	46,1%
lokal fortgeschritten	31	15,0%
Lokalisation des Tumors		
Pankreaskopf	130	63,1%
Pankreaskörper	23	11,2%
Pankreasschwanz	39	18,9%
Pankreaskörper und -schwanz	12	5,8%
Karzinom der Papille	2	1%
Histologie		
Adenokarzinom	199	96,6%
Azinuszellkarzinom	5	2,4%
unbekannt	2	1%
Grading		
G1 gut	7	3,9%
G2 mäßig	61	33,9%
G3 gering	107	59,4%
G4 undifferenziert	5	2,8%
fehlend	26	
ECOG bei Erstdiagnose		
ECOG 0	71	42,5%
ECOG 1	78	46,7%
ECOG 2	16	9,6%
ECOG 3	2	1,2%
ECOG fehlend	39	
CRP [mg/dL] (Median, Range)	0,68 [0-39,0]	
CA-19-9 [U/mL] (Median, Range)	166 [0-422 000]	
CEA [ng/mL] (Median, Range)	4,2 [0-483]	
Mediane Überlebenszeit (in Monaten)	18,3 [95% KI 15,1-21,5]	
Diabetes mellitus bei Erstdiagnose		
erkrankt	51	31,7%
nicht erkrankt	110	68,3%
Angabe fehlend	45	

Tabelle 3.1.1 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs „Der informative Patient“

ECOG = *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*, CRP = C-reaktives Protein, CA-19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9, CEA = Carcinoembryonales Antigen

Lokalisation der Metastasen bei Beginn der palliativen Therapie

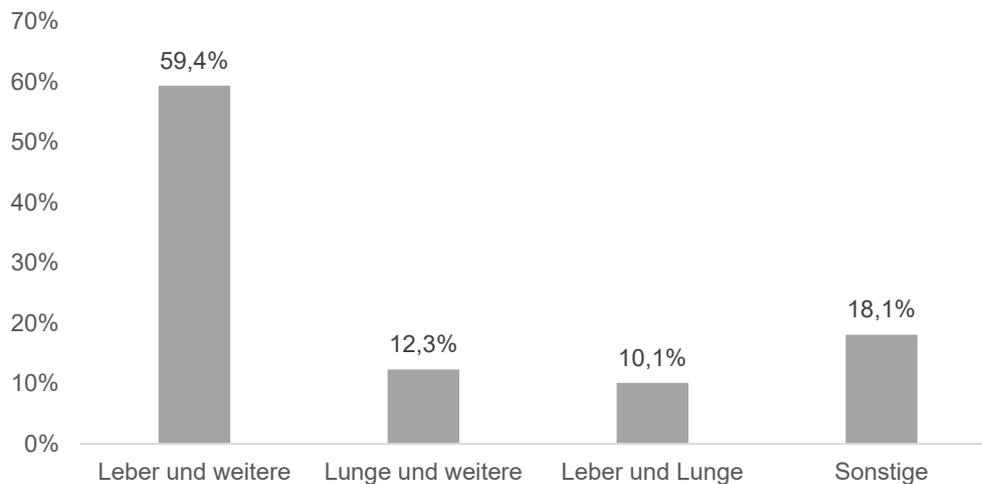


Abbildung 6: Lokalisation der Metastasen bei Beginn der palliativen Therapie des Patientenkollektivs „Der informative Patient“

Weitere Lokalisationen von Metastasen sind im Patientenkollektiv unter anderem: Peritonealkarzinose, Lymphknotenmetastasen, Knochenmetastasen. Am häufigsten zeigte sich eine Metastasierung in der Leber zu Beginn der palliativen Chemotherapie.

Bei Patienten, bei denen eine palliative Chemotherapie aufgrund eines fortgeschrittenen Lokalbefunds, einer Fernmetastasierung oder aufgrund eines Progresses nach Resektion eingeleitet wurde, erhielten als palliative Erstlinientherapie in 47,6% der Fälle eine Gemcitabin-basierte Chemotherapie. Eine 5-Fluorouracil-basierte Chemotherapie wurde 39,8% der Patienten verabreicht. Andere Chemotherapieprotokolle waren in 4,2% der Fälle die Therapie der ersten Wahl. Eine geringe Anzahl der Patienten erhielt in palliativer Intention initial eine Radiochemotherapie (6,5%). Andere Therapien wurden in 1,9% der Fälle durchgeführt.

Zum Zeitpunkt des *Data-Locks* im September 2018 waren bereits 85,4% der Patienten verstorben. Das mediane Gesamtüberleben der gesamten Studienpopulation lag bei 18,3 Monaten [95% KI 15,1 - 21,5]. Es war dabei ein signifikanter Unterschied je nach Erkrankungsstadium bei Erstdiagnose festzustellen ($p < 0,0001$): so lag das mediane Überleben der initial resektablen Patienten bei 29,9 Monaten [95% KI 25,5 - 34,3],

Patienten in lokal fortgeschrittenem Stadium lebten im Median 18,0 Monate [95% KI 10,1 - 25,9] und die metastasierten 10,5 Monate [95% KI 8,5 – 12,6].

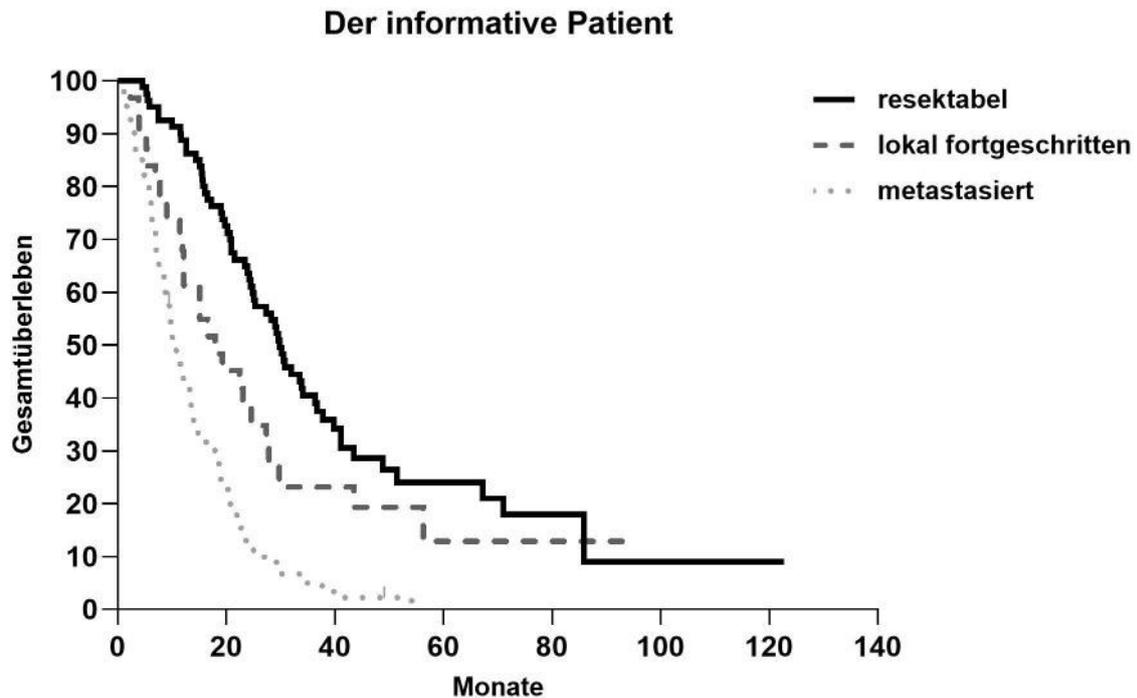


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve des Kollektivs „Der informative Patient“

Grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten mit initial resektablem, metastasiertem und lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom bei Erstdiagnose. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Log-Rank-Test: $p < 0,0001$

3.2 Patientencharakteristika der sPD-1 und sPD-L1 Stichprobe

Wie bereits im Abschnitt „Material und Methoden“ näher beschrieben, wurden im Rahmen des Forschungsprojekts „Der informative Patient“ am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität Patientendaten, Blutproben sowie Tumorproben von Patienten mit Pankreaskarzinom prospektiv gesammelt. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden im *Comprehensive Cancer Center* am LMU-Klinikum, Campus Großhadern behandelt oder stellten sich zu einer Zweitmeinung vor. Als Einschlusskriterium musste ein exokrines Pankreaskarzinom histologisch gesichert worden sein.

Im September 2015 führten wir das erste Mal eine Datenanalyse durch, um eine Patientengruppe zur Bestimmung von löslichem PD-1 und PD-L1 (sPD-1 und sPD-L1) zu identifizieren. Einen Überblick über die Ein- und Ausschlusskriterien gibt Abbildung 8. Zu den wichtigsten Einschlusskriterien gehörte, dass sich die Patienten zum Diagnosezeitpunkt bereits in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium befanden und dass eine Blutprobe vor Therapiebeginn asserviert wurde. Von 171 Patienten (Stand 09/2015) hatten 65 bei Diagnosestellung ein initial resektables Pankreaskarzinom und konnten deshalb nicht in die Studie eingeschlossen werden. Als weiteres Auswahlkriterium sollte die Beobachtungszeit bereits fortgeschritten sein, sodass die Diagnosestellung bis inklusive April 2015 erfolgt sein sollte. Schließlich konnten 41 Patienten eingeschlossen werden, da von ihnen auch Blutproben vor Beginn der palliativen Chemotherapie zur Verfügung standen. In dieser Gruppe an Patienten wurde bei allen Patienten das Pankreaskarzinom histologisch gesichert.

Ein *Data-Lock* wurde im September 2016 durchgeführt. Die 41 Patienten wurden bis dahin hinsichtlich des Überlebensstatus, des progressionsfreien Überlebens und der palliativen Therapie beobachtet. Weitere Patienten, die der Kohorte „Der informative Patient“ angehören und nicht für die Subgruppe zur Bestimmung der sPD-1 und sPD-L1 Serumkonzentration ausgewählt wurden, wurden bis September 2018 nachbeobachtet.

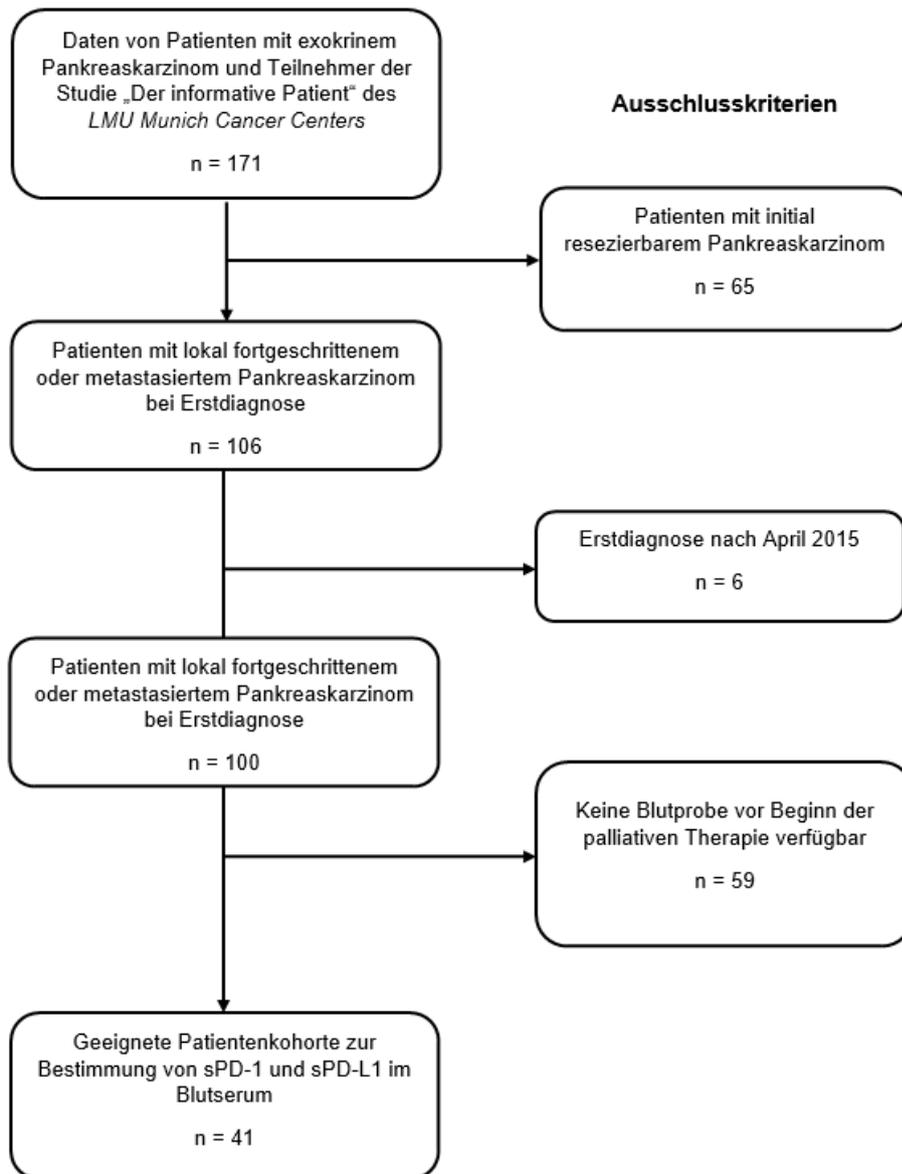


Abbildung 8: Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien zur Bestimmung der sPD-1 und sPD-L1 Stichprobe

Einschlusskriterien: Patienten mit exokrinem Pankreaskarzinom, fortgeschrittenes Stadium bei Erstdiagnose, Erstdiagnose bis inklusive April 2015, Serumproben wurden vor Beginn der palliativen Chemotherapie asserviert und stehen zur Verfügung

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*, sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

In der ausgewählten Patientenuntergruppe hatten 40 Personen ein duktales Adenokarzinom und 1 Patient ein Azinuszellkarzinom. Bei 6 Patienten lag zu Therapiebeginn ein lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom vor, bei den übrigen 35 Patienten waren Metastasen festgestellt worden. Bis zum Ende des *Follow-ups* im September 2016 waren bereits 35 Patienten gestorben. Das mediane

Gesamtüberleben der Studienkohorte lag bei 10,8 Monaten (95% KI 6,1 bis 15,5 Monate) und die Zeit des medianen *Follow-ups* lag bei 24 Monaten (95% KI 19,6 bis 30,0 Monate). 11 Patienten erhielten als *First-Line*-Chemotherapie eine Gemcitabin Monotherapie und weitere 11 Patienten eine Chemotherapie, welche auf Gemcitabin basierte. Eine 5-Fluorouracil-haltige Therapie erhielten 18 Patienten, von denen 10 Erkrankte die Chemotherapiekombination FOLFIRINOX erhielten. 1 Patient wurde mit einer palliativen Radiochemotherapie behandelt. Einen Überblick über die Charakteristika der sPD-1 und sPD-L1 Patienten gibt Tabelle 3.2.1.

Alter in Jahren (Median, Range)	66,9 [38 - 81]	
Geschlecht		
männlich	23	56,1%
weiblich	18	43,9%
Tumorstadium bei Erstdiagnose		
metastasiert	35	85,4%
lokal fortgeschritten	6	14,6%
Lokalisation des Tumors		
Pankreaskopf	23	56,1%
Pankreaskörper	3	7,3%
Pankreasschwanz	13	31,7%
Pankreaskörper und -schwanz	2	4,9%
Histologie		
Adenokarzinom	40	97,6%
Azinuszellkarzinom	1	2,4%
Grading		
G1 gut	1	3,0%
G2 mäßig	9	27,3%
G3 gering	19	57,6%
G4 undifferenziert	4	12,1%
fehlend	8	
ECOG bei Erstdiagnose		
ECOG 0	20	50,0%
ECOG 1	18	45,0%
ECOG 2	1	2,5%
ECOG 3	1	2,5%
ECOG fehlend	1	
Mediane Überlebenszeit (in Monaten)	10,8 [95% KI 6,1 - 15,5]	
First Line Therapie		
Gemcitabin Monotherapie	11	26,8%
Gemcitabin-haltige Kombinations- Chemotherapie	11	26,8%
FOLFIRINOX-haltige Kombinations- Chemotherapie	8	19,5%
5-Fluorouracil-haltige Kombinations- Chemotherapie	10	24,4%
Radiochemotherapie	1	2,4%

Tabelle 3.2.1 Klinische Charakteristika der sPD-1 und sPD-L1 Stichprobe

sPD-1 = Soluble programmed cell death protein 1, sPD-L1 = Soluble programmed death ligand 1,

ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

3.3 Klinische Charakteristika der Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median

Die Patienten wurden anhand der sPD-1 und sPD-L1-Konzentration in zwei Gruppen eingeteilt. Die Unterteilung erfolgte mittels Medians. Die klinischen Charakteristika waren in beiden Gruppen in etwa vergleichbar. Für sPD-1 siehe Tabelle 3.3.1; für sPD-L1 siehe Tabelle 3.3.2.

Um das mittlere Gesamtüberleben der zwei Patientengruppen zu vergleichen, wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet. Hierbei zeigte sich im Log-rank-Test kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median. Bei dem Vergleich von sPD-1 < Median mit sPD-1 ≥ Median ergab sich ein medianes Gesamtüberleben von 11,9 beziehungsweise 9,5 Monaten ($p = 0,78$; Abbildung 9). Bei dem Vergleich von sPD-L1 < Median mit sPD-L1 ≥ Median ergab sich ein medianes Gesamtüberleben von 11,9 beziehungsweise 9,5 Monaten ($p = 0,36$; Abbildung 10). Ähnliche Resultate zeigten sich, wenn anstelle des Medians die 75. Perzentile als Grenzwert gewählt wurde (Abbildung 11 und Abbildung 12). Auch bei der Verwendung von sehr hohen Werten als Grenzwerte, welche in dieser Studie für sPD-1 mit $> 1\text{ng/ml}$ und für sPD-L1 mit $> 0,1\text{ng/ml}$ definiert wurden, zeigten sich ähnliche Resultate (Abbildung 13 und Abbildung 14).

Auch um das progressionsfreie Überleben (PFS) zu ermitteln und zu vergleichen, wurde die Kaplan-Meier-Methode angewandt. Hierbei wurde die Zeit von der Erstdiagnose bis zum Progress der Erkrankung unter Erstlinientherapie bestimmt. Als *Cut-off-Wert* wurde hier ebenfalls der Median gewählt. Bei dem Vergleich von den Patienten mit sPD-1 < Median mit sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median mit sPD-L1 ≥ Median zeigte sich kein signifikanter Unterschied im PFS. Das mediane progressionsfreie Überleben lag bei der Untersuchung der sPD-1 Serumspiegel bei sPD-1 < Median bei 5,5 Monaten und bei sPD-1 ≥ Median bei 7,9 Monaten ($p = 0,66$). Bei der Untersuchung der sPD-L1 Werte lag das mediane progressionsfreie Überleben bei sPD-L1 < Median bei 4,3 Monaten und bei sPD-L1 ≥ Median bei 8,0 Monaten ($p = 0,55$). Siehe Abbildungen 15 und 16.

	sPD-1 < Median (n = 20)	sPD-1 ≥ Median (n = 21)
Alter Jahre (Median, Range)	66,05 [44 - 81]	67,10 [38 - 77]
CRP mg/dl (Median, Range)	1,6 [0,1 - 32,8]	1,4 [0,1 - 14,6]
Leukozyten G/l (Median, Range)	7,3 [4,5 - 18,0]	7,2 [4,3 - 18,0]
CA-19-9 U/ml (Median, Range)	364 [2,6 - 122 000]	1455 [2,6 - 422 000]
CEA ng/ml (Median, Range)	4,3 [0,7 - 122]	10,2 [0,2 - 432]
Tumorstadium		
Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	2	4
Metastasiertes Pankreaskarzinom	18	17
Performance Status		
ECOG 0	10	10
ECOG 1	9	9
ECOG 2	0	1
ECOG 3	1	0
ECOG nicht vorhanden	0	1
Medianes Gesamtüberleben (Monate)		
	9,53 [95% KI: 5,06 - 13,99]	11,93 [95% KI: 6,13 – 17,72]

Tabelle 3.3.1 Vergleich der Patientencharakteristika von sPD-1 < Median mit sPD-1 ≥ Median

Median sPD-1 = 0,117 ng/ml

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*, CRP = C-reaktives Protein, CA-19-9 =

Carbohydrat-Antigen 19-9, CEA = Carcinoembryonales Antigen, ECOG = *Eastern Cooperative*

Oncology Group Performance Status

	sPD-L1 < Median (n = 20)	sPD-L1 ≥ Median (n = 21)
Alter Jahre (Median, Range)	66,05 [41 - 81]	67,10 [38 - 77]
CRP mg/dl (Median, Range)	0,9 [0,1 - 14,6]	1,6 [0,1 - 32,8]
Leukozyten G/L (Median, Range)	7,2 [4,5 - 18,0]	7,4 [4,3 - 18,0]
CA-19-9 U/ml (Median, Range)	353 [2,6 - 16 257]	1466 [2,6 - 422 000]
CEA ng/ml (Median, Range)	4,0 [0,7 - 59,8]	9,0 [0,2 - 432]
Tumorstadium		
Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	3	3
Metastasiertes Pankreaskarzinom	17	18
Performance Status		
ECOG 0	10	10
ECOG 1	9	9
ECOG 2	0	1
ECOG 3	1	0
ECOG nicht vorhanden	0	1
Medianes Gesamtüberleben (Monate)		
	9,53 [95% KI: 5,06 - 13,99]	11,92 [95% KI: 6,41 - 17,44]

Tabelle 3.3.2 Vergleich der Patientencharakteristika von sPD-L1 < Median mit sPD-L1 ≥ Median

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*, CRP = C-reaktives Protein, CA-19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9, CEA = Carcinoembryonales Antigen, ECOG = *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*

soluble PD-1

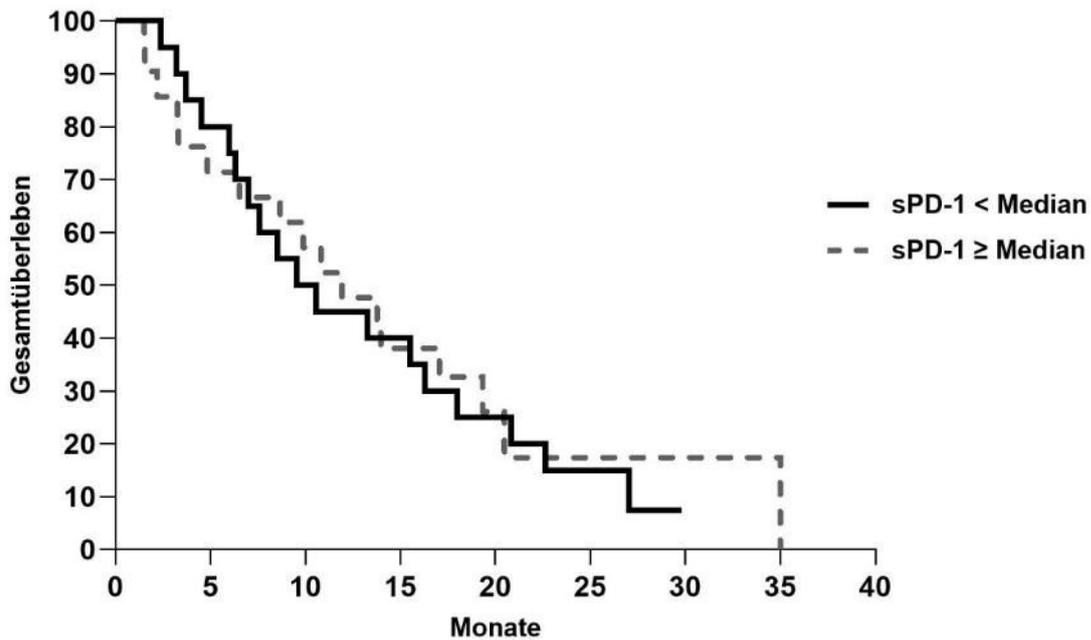


Abbildung 9: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde der Median gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Median sPD-1 = 0,117 ng/ml

Log-Rank-Test p = 0,78

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

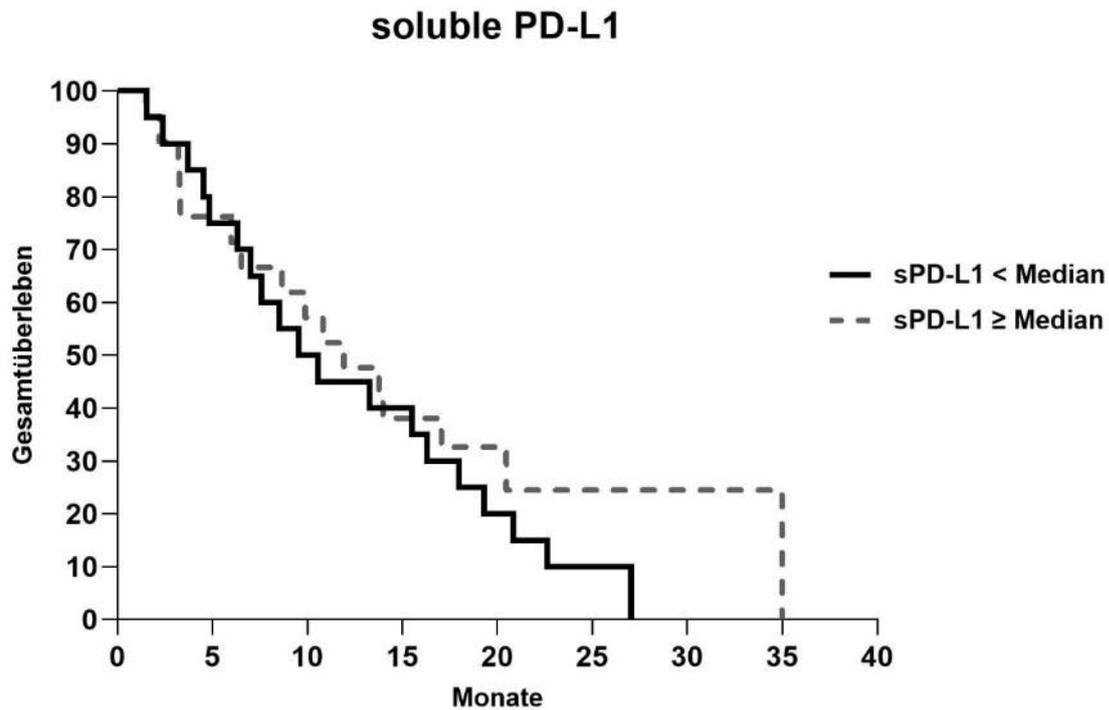


Abbildung 10: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-L1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde der Median gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

Log-Rank-Test: $p = 0,36$

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

soluble PD-1

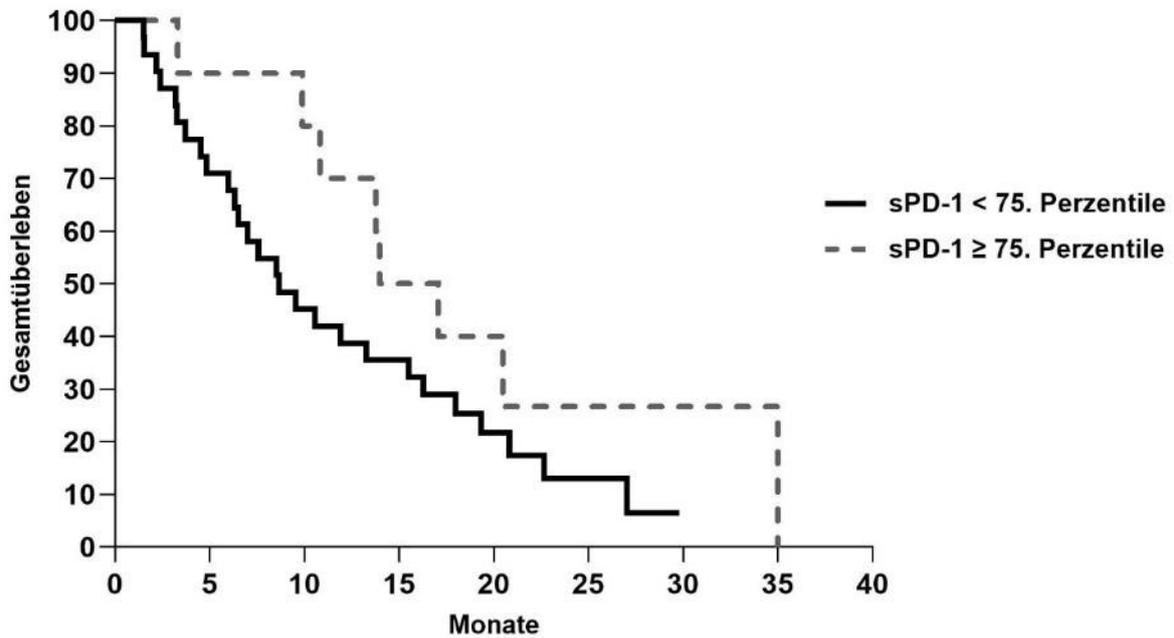


Abbildung 11: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-1 < 75. Perzentile verglichen mit sPD-1 ≥ 75. Perzentile

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde die 75. Perzentile gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Log-Rank-Test: $p = 0,15$

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

soluble PD-L1

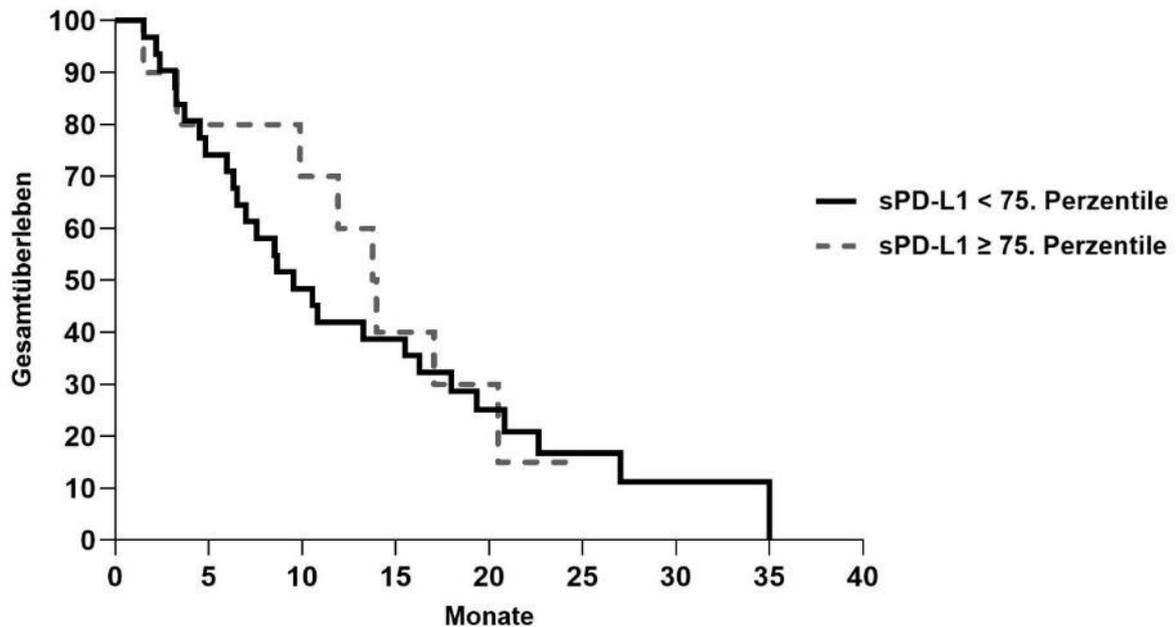


Abbildung 12: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-L1 < 75. Perzentile verglichen mit sPD-L1 ≥ 75. Perzentile

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-L1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde die 75. Perzentile gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Log-Rank-Test: $p = 0,73$

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

soluble PD-1

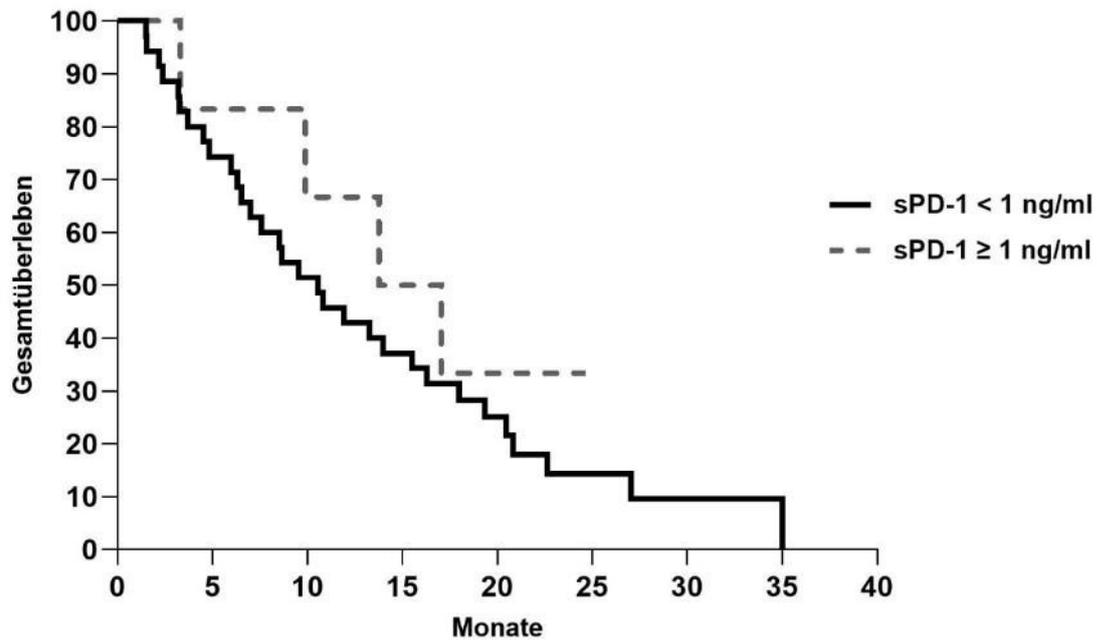


Abbildung 13: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-1 < 1 ng/ml verglichen mit sPD-1 ≥ 1 ng/ml

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde sPD-1 ≥ 1ng/ml gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Log-Rank-Test: $p = 0,42$

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

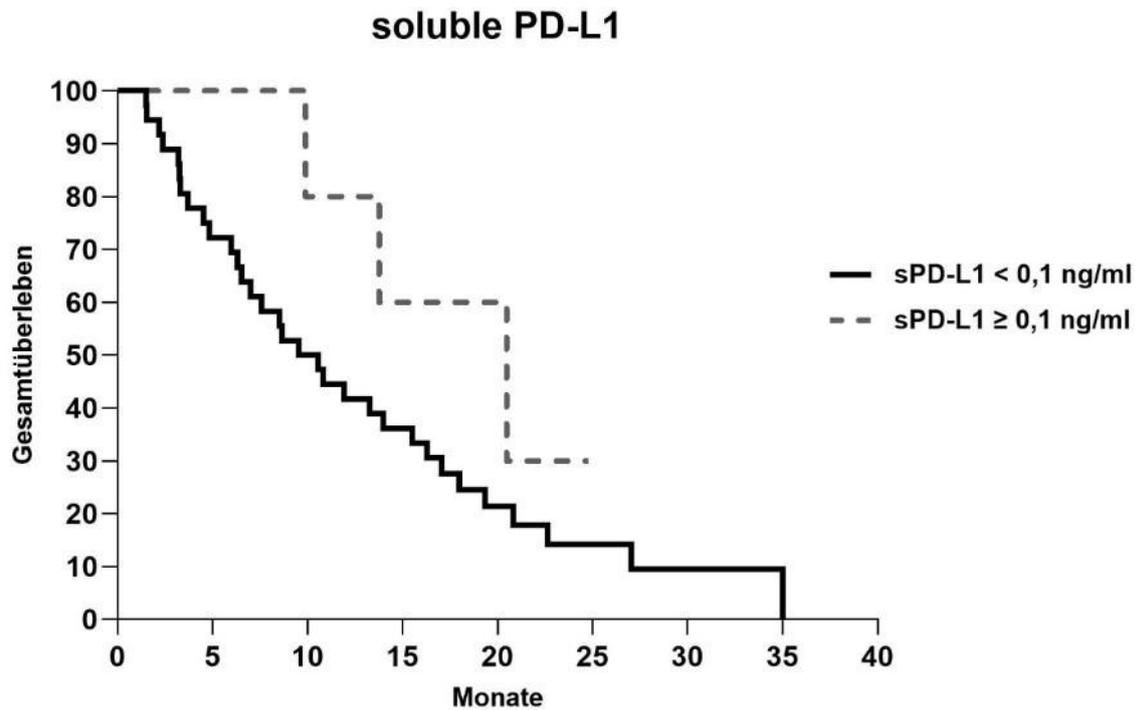


Abbildung 14: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-L1 < 0,1 ng/ml verglichen mit sPD-L1 ≥ 0,1 ng/ml

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-L1 Serumwerten. Als *Cut-off-Wert* wurde sPD-L1 ≥ 0,1ng/ml gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Log-Rank-Test: $p = 0,19$

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

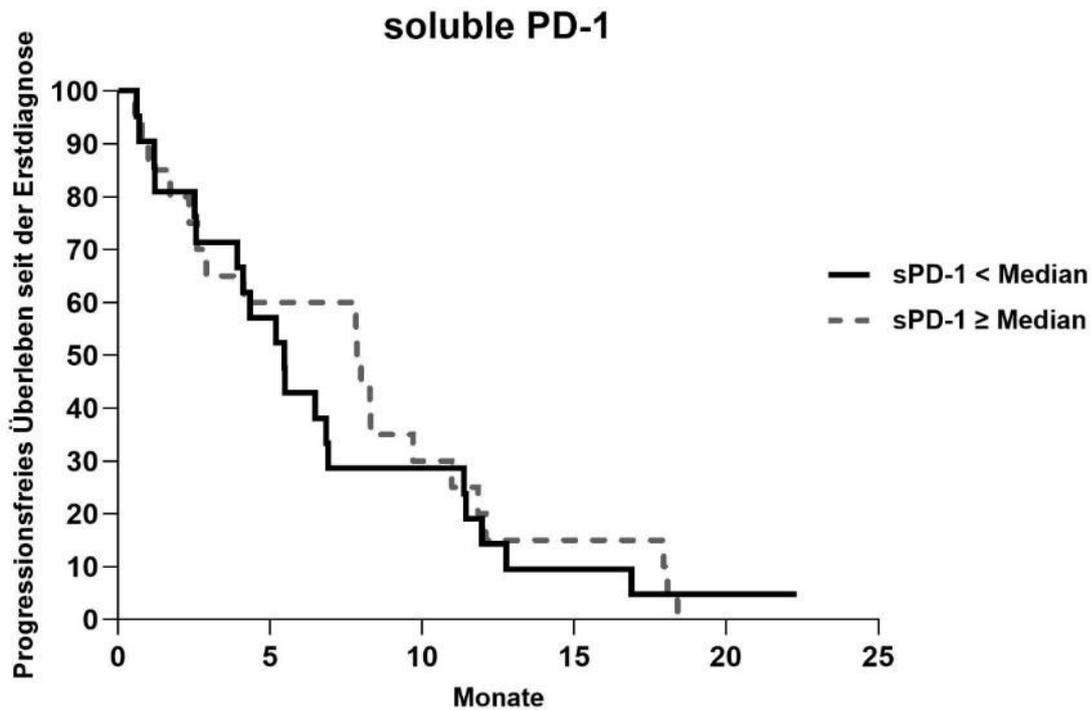


Abbildung 15: Progressionsfreies Überleben seit der Erstdiagnose von Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der progressionsfreien Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde der Median gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die progressionsfreie Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Median sPD-1 = 0,117 ng/ml

Log-Rank-Test: $p = 0,66$

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

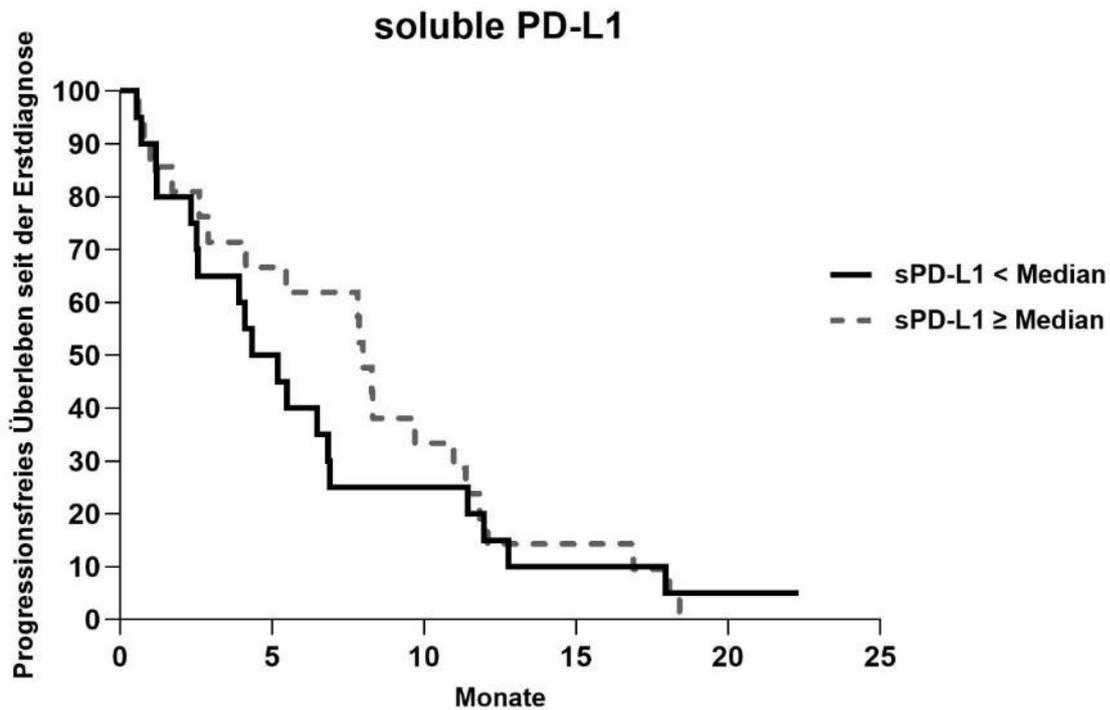


Abbildung 16: Progressionsfreies Überleben seit der Erstdiagnose von Patienten mit sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der progressionsfreien Überlebensraten der Patienten anhand von sPD-L1 Serumwerten. Als *Cut-off*-Wert wurde der Median gewählt. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die progressionsfreie Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

Log-Rank-Test: $p = 0,55$

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

3.4 Einfluss der sPD-1 und sPD-L1 Werte auf das Gesamtüberleben mittels Cox Regression

Um den Einfluss der sPD-1 und sPD-L1 Werte auf das Gesamtüberleben zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit das Cox'sche Regressionsmodell unter Hinzunahme von etablierten Prognosefaktoren bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom genutzt.

Als etablierte Prognosefaktoren wurden das Alter, der ECOG Performance-Status, sowie die Menge an CA 19-9 und CRP im Serum zu Therapiebeginn verwendet. Den Erwartungen entsprechend zeigten Patienten mit einem hohen CRP Wert und einem hohen prätherapeutischen CA 19-9 Wert (> 1000 U/ml) eine ungünstige Prognose. Weder die sPD-1 noch die sPD-L1 Werte korrelierten mit einem kürzeren Gesamtüberleben (HR für sPD-1: 0,74 [0,44 - 1,24]; HR für sPD-L1: 0,23 [0,01 - 13,52]). Siehe Tabelle 3.4.1.

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95% KI	P Wert	HR	95% KI	P Wert
Alter > 65 Jahre	1,13	[0,56 - 2,28]	0,74			
ECOG > 1	1,48	[0,20 - 10,92]	0,70			
CA19-9 > 1000 U/ml	1,96	[0,98 - 3,9]	0,06	2,29	[1,07 - 4,9]	< 0,05
CRP [mg/dl]	1,06	[1,01 - 1,11]	< 0,05	1,08	[1,02 - 1,13]	< 0,01
sPD-1 [ng/ml]	0,74	[0,44 - 1,24]	0,25	0,74	[0,01 - 489,78]	0,93
sPD-L1 [ng/ml]	0,23	[0,01 - 13,52]	0,48	0,90	[0,37 - 2,20]	0,82

Tabelle 3.4.1 Prognostische Relevanz von sPD-1 und sPD-L1

Analyse des Einflusses von sPD-1 und sPD-L1 sowie bereits etablierter Faktoren auf das Gesamtüberleben mittels Cox Regressionsmodell.

sPD-1 = Soluble programmed cell death protein 1, sPD-L1 = Soluble programmed death ligand 1, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, CA 19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9, CRP = C-reaktives Protein, HR = Hazard-Rate, KI = Konfidenzintervall

3.5 CA 19-9 und CEA bei Patienten mit sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median

CA 19-9 und CEA sind etablierte Serum-Tumormarker des Pankreaskarzinoms. Sie geben Rückschlüsse auf die Prognose und die Tumorlast [1, 18, 70]. Wie zu erwarten, zeigte sich in unserem Kollektiv eine positive Korrelation dieser beiden Tumormarker (Abbildung 17). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson liegt bei $r = 0,63$ und das Signifikanzniveau bei $p < 0,0001$.

Um zu untersuchen ob sPD-1 und/oder sPD-L1 mit der Tumorlast korrelieren, verwendeten wir CA 19-9 und CEA als Surrogat-Parameter. Ein Vergleich zwischen den Mittelwerten von CA 19-9 und CEA in den Gruppen mit sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 18 und 19). Um den Unterschied der Mittelwerte auf ihre Signifikanz zu prüfen, wurde der t-Test verwendet. Der Mittelwert für CA 19-9 lag in der Gruppe mit sPD-L1 < Median bei 2589 U/ml und in der Gruppe mit sPD-L1 ≥ Median bei 36674 U/ml, $p = 0,14$. Der Mittelwert für CEA lag in der Gruppe mit sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median lag bei 8,8 ng/ml beziehungsweise bei 52,9 ng/ml, $p = 0,09$.

Auch die Korrelation zwischen individuellen sPD-L1 Werten und den individuellen Werten von CA 19-9 $r = 0,02$ (Abbildung 20) und CEA $r = 0,09$ (Abbildung 21) zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Die Berechnungen mit sPD-1 zeigten ähnliche Ergebnisse und werden hier nicht angeführt. Zusammenfassend konnte also kein Zusammenhang zwischen Tumorlast und sPD-1 oder sPD-L1 Werten im Serum nachgewiesen werden.

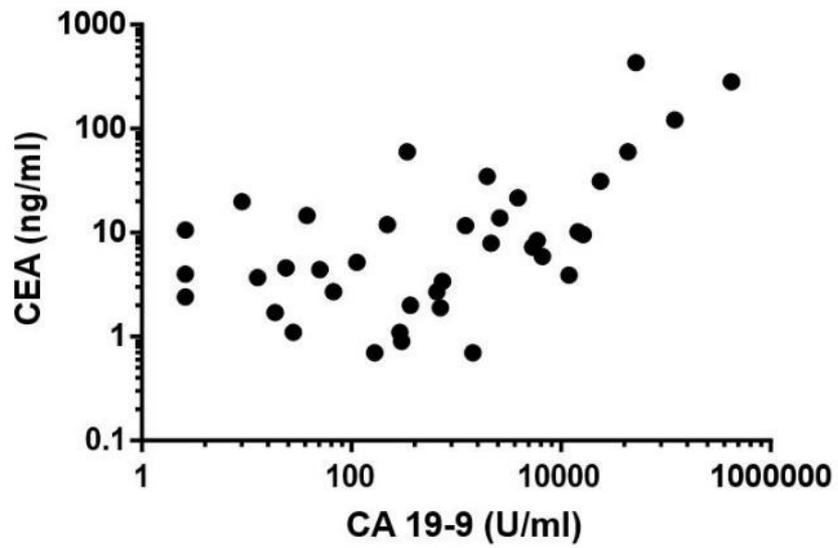


Abbildung 17: Positive Korrelation zwischen den Tumormarkern CA 19-9 und CEA

Korrelationsanalyse nach Pearson: $r = 0,63$; $p < 0,0001$

CEA = Carcinoembryonales Antigen, CA-19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9

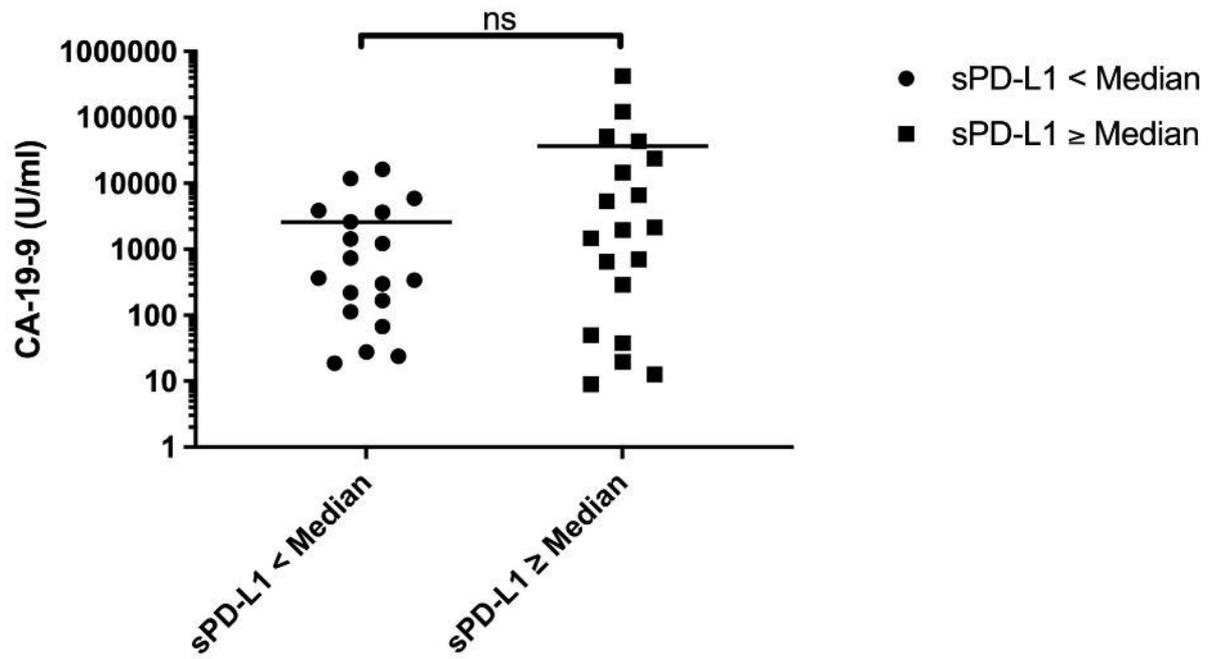


Abbildung 18: Mittelwerte von CA-19-9 bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

t-Test: $p = 0,14$

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*, CA-19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9

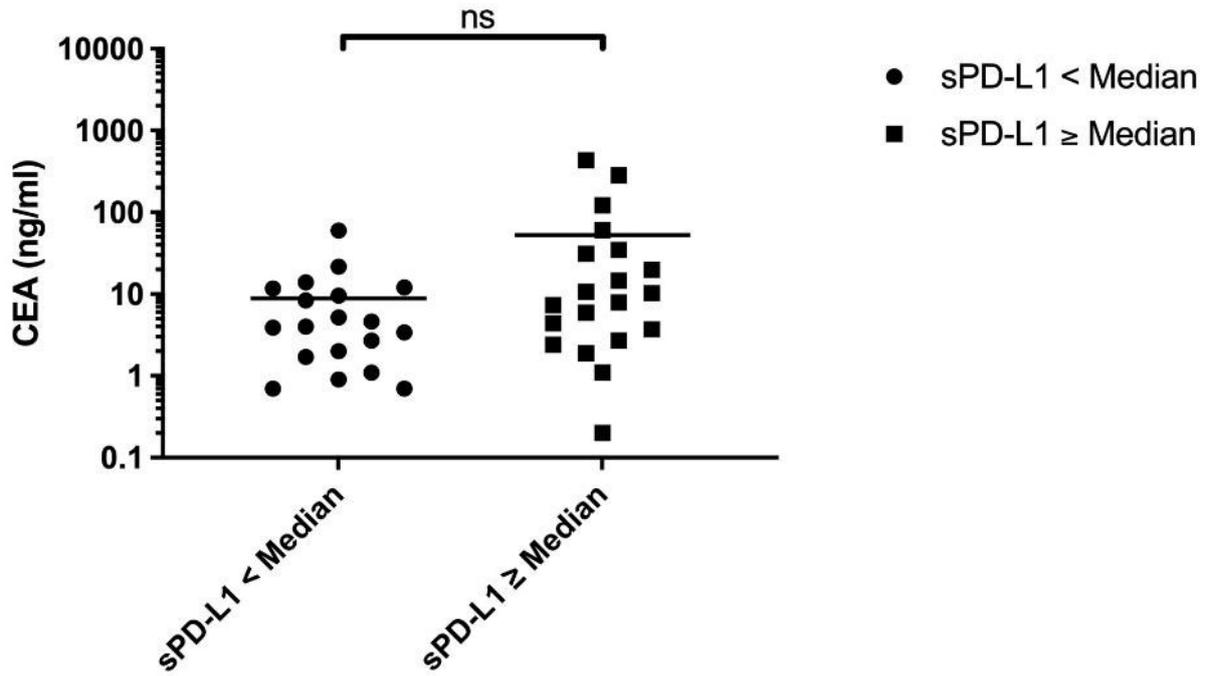


Abbildung 19: Mittelwerte von CEA bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

t-Test: p = 0,09

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*, CEA = Carcinoembryonales Antigen

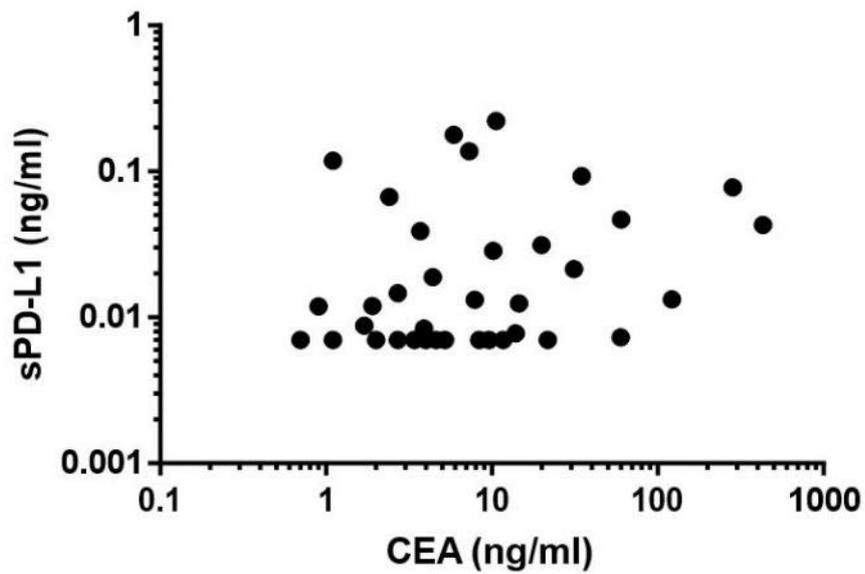


Abbildung 20: Korrelation zwischen individuellen CA 19-9 und sPD-L1 Werten

Korrelationsanalyse nach Pearson: $r = 0,02$; $p = 0,9$

CA-19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9, sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

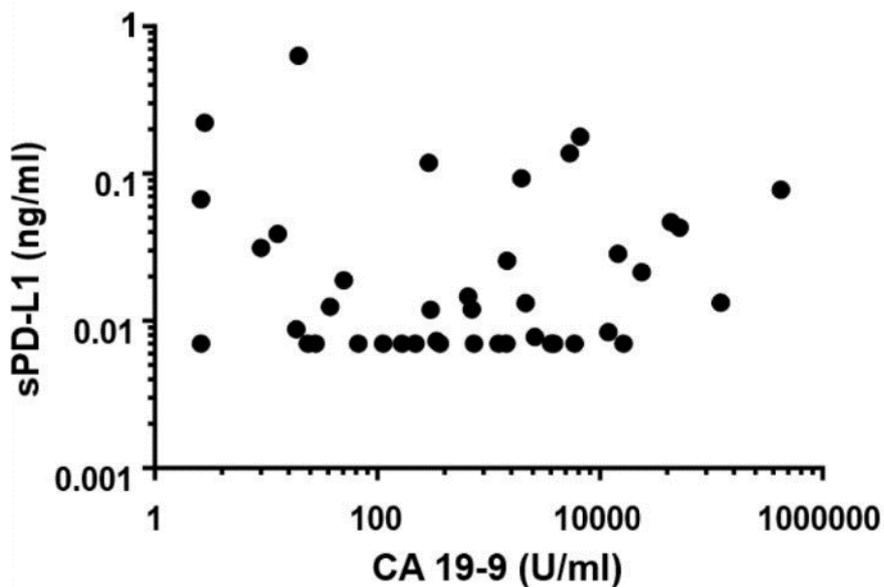


Abbildung 21: Korrelation zwischen individuellen CEA und sPD-L1 Werten

Korrelationsanalyse nach Pearson: $r = 0,09$; $p = 0,59$

CA-19-9 = Carbohydrat-Antigen 19-9, sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

3.6 Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und den CRP Werten

Wie auch in der Diskussion genauer aufgeführt, ist sPD-1 und sPD-L1 nicht nur bei malignen Erkrankungen, sondern auch bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen nachweisbar. Um Herauszufinden ob sPD-1 und/oder sPD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom mit dem Ausmaß der systemischen Inflammation korreliert, führten wir verschiedene Untersuchungen durch. Bei genauerer Betrachtung von sehr hohen Werten von sPD-1 und sPD-L1 (für sPD-1 > 1ng/ml und sPD-L1 > 0,1ng/ml) ließ sich feststellen, dass diese Werte fast ausschließlich bei jenen Patienten zu finden waren, welche auch eine Erhöhung von CRP aufwiesen ($p < 0,01$ für sPD-1 und $p < 0,0001$ für sPD-L1). Als Schwelle des CRPs diente dabei der in der Labordiagnostik anerkannte Grenzwert (0,5 mg/dl). Getestet wurden hierfür die Varianzen mittels F-Test.

Auch die Mittelwerte für sPD-1 und sPD-L1 waren bei Patienten mit erhöhtem CRP tendenziell höher. Hier ergab sich für sPD-1 ein Mittelwert von 490 pg/ml bei Patienten mit erhöhtem CRP und ein Mittelwert von 230 pg/ml bei normalem CRP ($p = 0,36$) (Abbildung 22). Für sPD-L1 ergaben sich Mittelwerte von 60 pg/ml beziehungsweise 18 pg/ml bei erhöhtem beziehungsweise normalen CRP ($p = 0,28$) (Abbildung 23). Statistisch signifikant waren diese Unterschiede jedoch nicht.

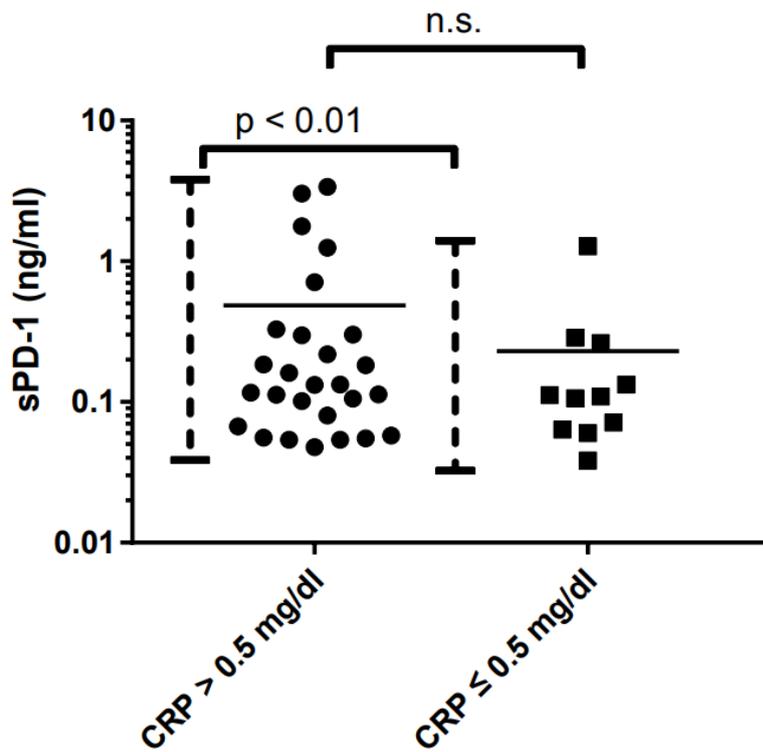


Abbildung 22: sPD-1 Mittelwerte bei normalem und erhöhtem CRP

Vergleich der Mittelwerte von sPD-1 bei CRP > 0,5mg/dl und CRP ≤ 0,5mg/dl

t-Test: p = 0,36

F-Test: p < 0,01

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*, CRP = C-reaktives Protein

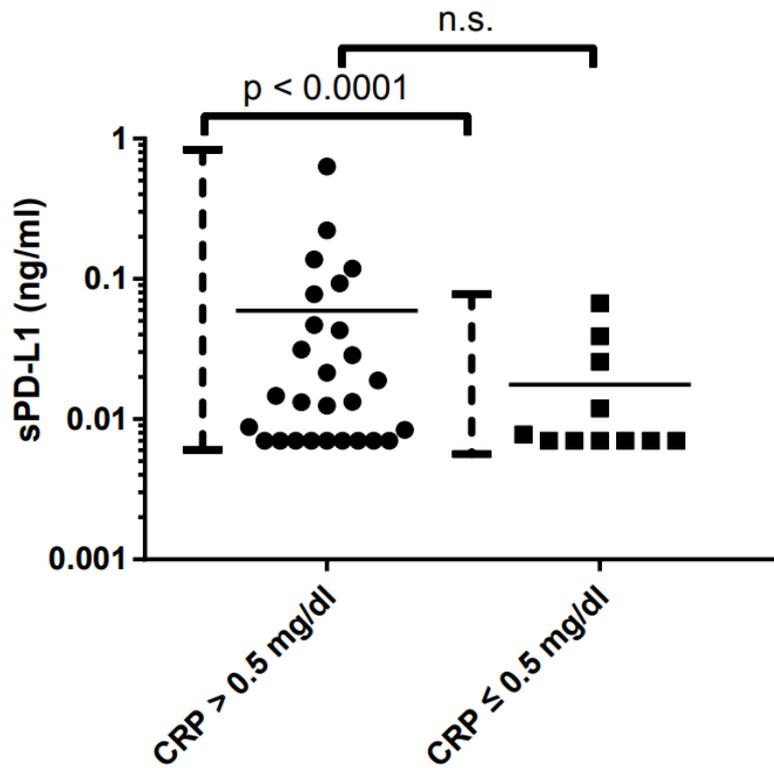


Abbildung 23: sPD-L1 Mittelwerte bei normalem und erhöhtem CRP

Vergleich der Mittelwerte von sPD-L1 bei CRP > 0,5mg/dl und CRP ≤ 0,5mg/dl

t-Test: p = 0,28

F-Test: p < 0,0001

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*, CRP = C-reaktives Protein

3.7 Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Leukozytenzahl

Auch die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut ist ein Indikator für die Ausprägung der systemischen Inflammation. Es wurde daher im Rahmen der Studie überprüft, ob es eine Beziehung zwischen der Leukozytenzahl und sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Werten gibt. Hierbei zeigte sich jedoch in beiden Fällen, dass keine statistisch signifikante Korrelation vorhanden ist. Für den Zusammenhang von sPD-1 und der Anzahl der Leukozyten ergab sich ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von $r = 0,23$; $p = 0,16$ (Abbildung 24). Für den Zusammenhang von sPD-L1 und der Anzahl der Leukozyten ergab sich ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von $r = -0,1$; $p = 0,54$ (Abbildung 25).

Es wurden auch die Mittelwerte der Leukozyten bei sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 \geq Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 \geq Median untersucht. Hierbei ergab sich ein Mittelwert der Leukozyten sPD-1 < Median von 7,8 G/L beziehungsweise von 7,6 G/L bei sPD-1 \geq Median. Der Unterschied ist nicht signifikant $p = 0,89$ (Abbildung 26). Bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 \geq Median ergab sich ein Mittelwert der Leukozyten von 7,6 G/L beziehungsweise von 7,8 G/L. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied: $p = 0,79$ (Abbildung 27).

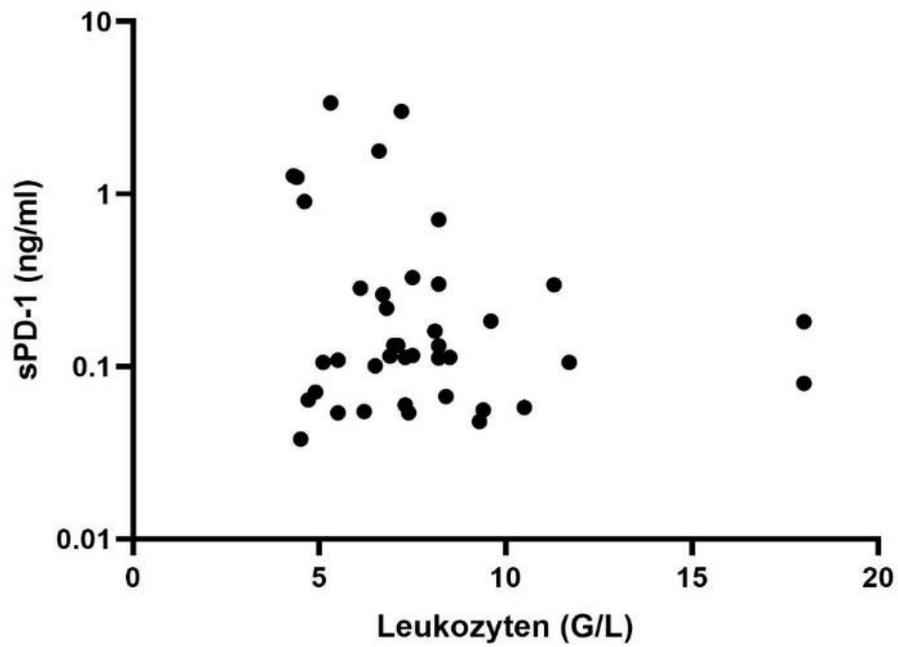


Abbildung 24: Korrelation zwischen sPD-1 und Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose

Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,23$; $p = 0,16$
sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

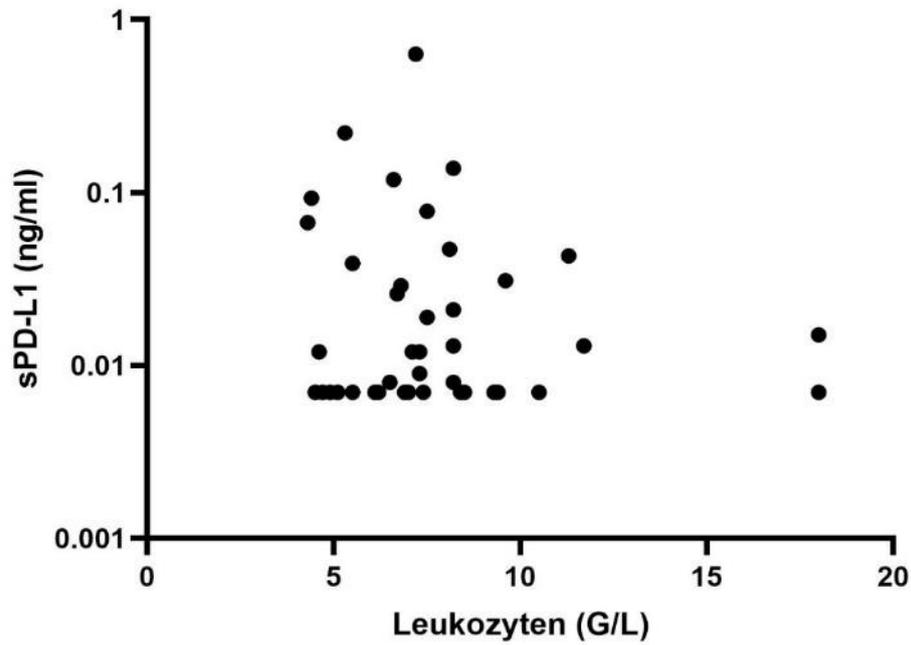


Abbildung 25: Korrelation zwischen sPD-L1 und Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose

Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = -0,1$; $p = 0,54$
 sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

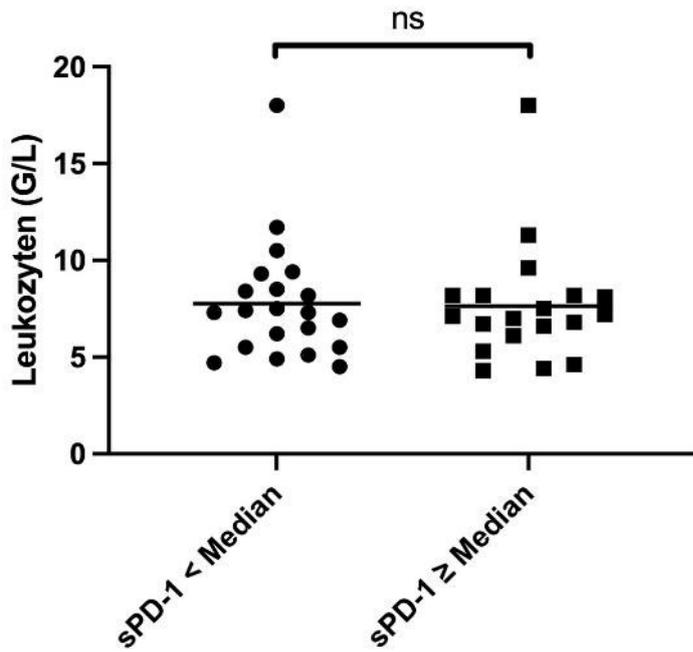


Abbildung 26: Mittelwerte der Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median

Median sPD-1 = 0,117 ng/ml

t-Test: p = 0,89

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

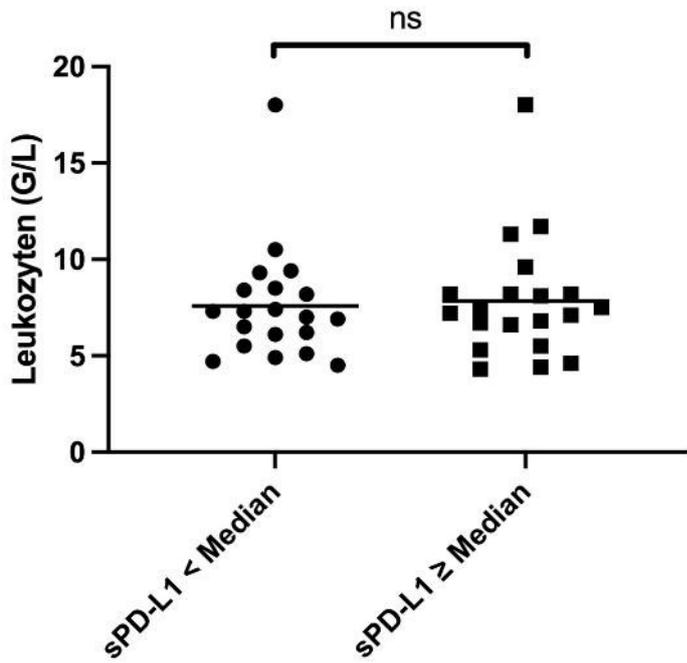


Abbildung 27: Mittelwerte der Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

t-Test: p = 0,79

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand1*

3.8 Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Thrombozytenzahl

Im Zuge der Untersuchungen wurde nach einem Zusammenhang zwischen den Thrombozyten und den sPD-1 und sPD-L1 Werten gesucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation. Die Ergebnisse für die Korrelation nach Pearson ergaben für die sPD-1 Werte einen Koeffizienten von $r = 0,0$; $p = 0,99$ (Abbildung 28) und für sPD-L1 einen Koeffizienten von $r = 0,19$; $p = 0,24$ (Abbildung 29).

Es ergab sich ein Mittelwert der Thrombozyten bei sPD-1 < Median von $275,5 \times 10^3/L$ beziehungsweise von $246,2 \times 10^3/L$ bei sPD-1 \geq Median; $p = 0,3$ (Abbildung 30). Bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 \geq Median ergab sich ein Mittelwert der Thrombozyten von $277,6 \times 10^3/L$ beziehungsweise von $245,7 \times 10^3/L$; $p = 0,26$ (Abbildung 31). Bei der Betrachtung der Mittelwerte der Thrombozyten sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 \geq Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 \geq Median ergab sich ebenfalls jeweils kein statistisch signifikanter Unterschied.

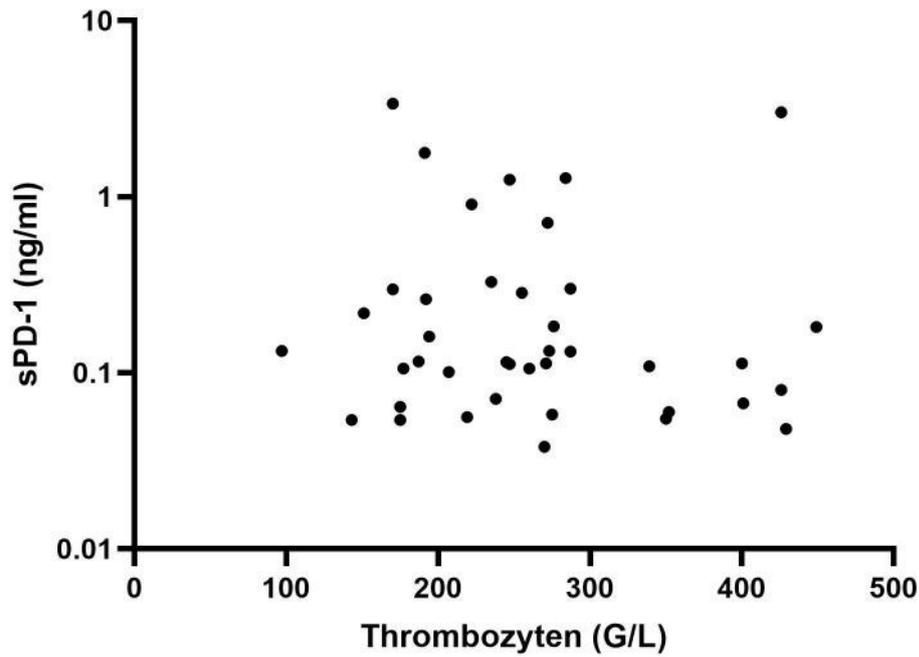


Abbildung 28: Korrelation zwischen sPD-1 und Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose

Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,0$; $p = 0,99$
 sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

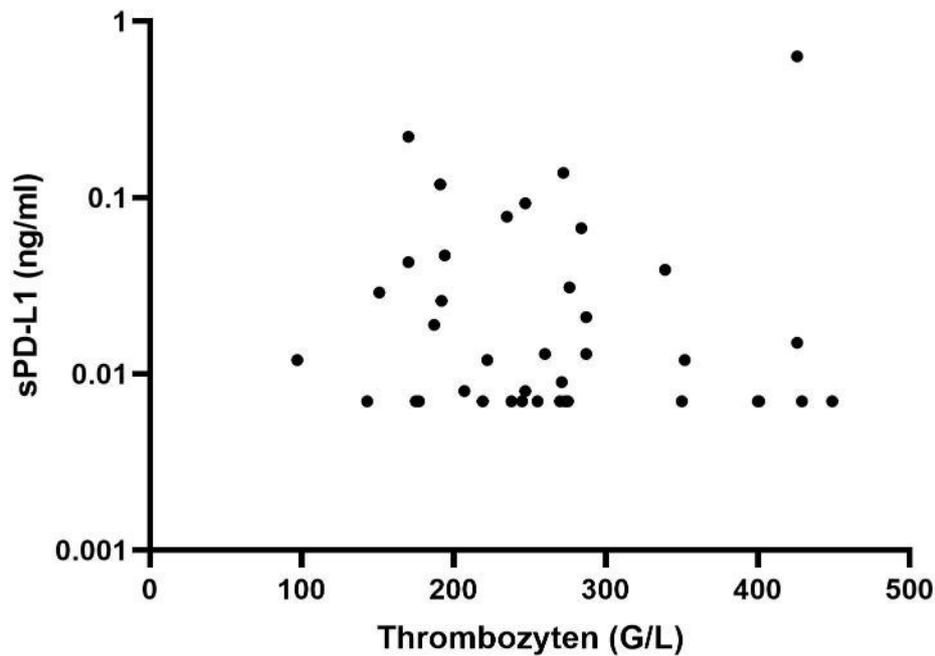


Abbildung 29: Korrelation zwischen sPD-L1 und Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose

Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,19$; $p = 0,24$
 sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

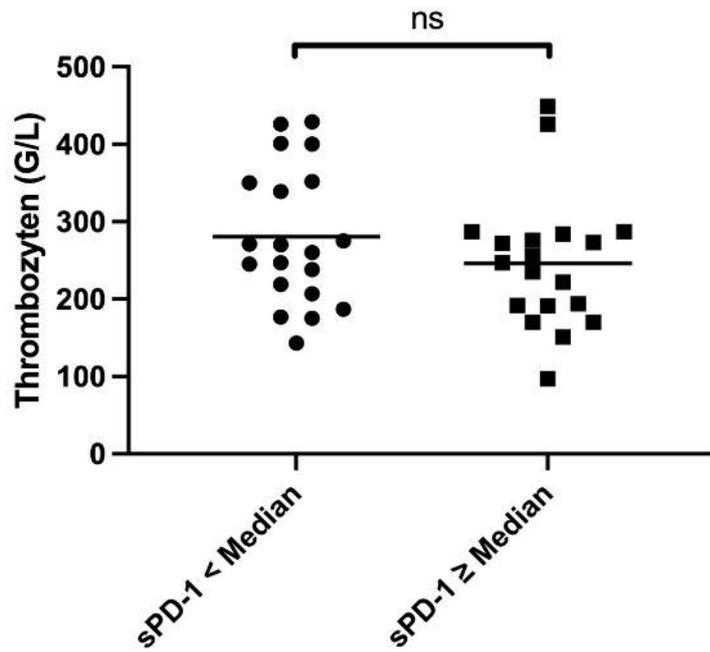


Abbildung 30: Mittelwerte der Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median

Median sPD-1 = 0,117 ng/ml

t-Test: p = 0,3

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*

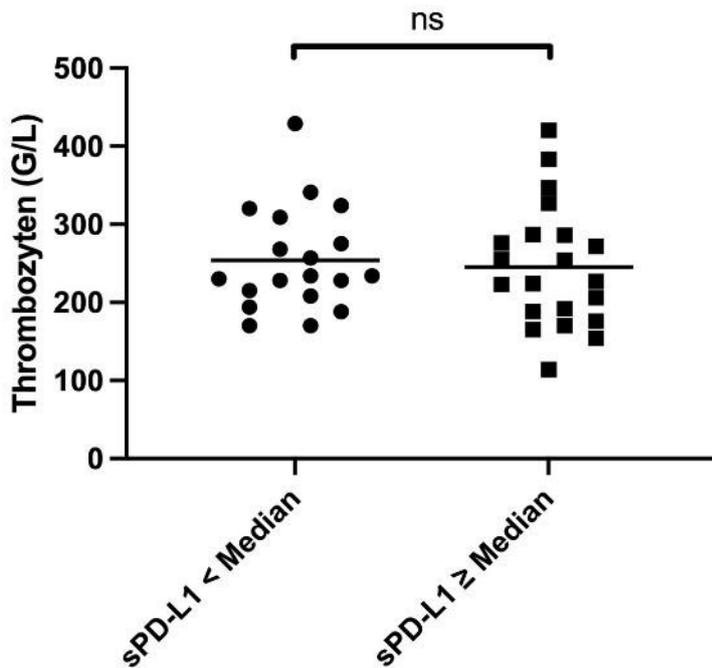


Abbildung 31: Mittelwerte der Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median

Median sPD-L1 = 0,012 ng/ml

t-Test: p = 0,26

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

3.9 Korrelation zwischen den sPD-1 und sPD-L1 Werten bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Die Korrelation zwischen sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 und der Höhe des CRP Werts legt einen Zusammenhang zwischen dem sPD-1 und sPD-L1 Serumwert und dem Ausmaß der systemischen Inflammation nahe. Bei Autoimmunerkrankungen ist ebenfalls eine Korrelation zwischen den sPD-1 und sPD-L1 Werten im Serum beschrieben, was eine gemeinsame Quelle für sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen nahelegt (siehe auch Diskussion) [71]. Bei Patienten mit Tumorerkrankungen war eine solche Korrelation unseres Wissens noch nicht durchgeführt worden.

Bei allen Patienten konnte im Serum sPD-1 nachgewiesen werden. sPD-L1 hingegen war in 15 Fällen unterhalb der Messbarkeitsgrenze. Der Median für sPD-1 lag bei 0,117 ng/ml (*Range* 0,038 - 25,93 ng/ml) und für sPD-L1 bei 0,012 ng/ml (*Range* 0,007

- 0,632 ng/ml). Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen den sPD-1 und sPD-L1 Werten. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson liegt bei $r = 0,341$ und das Signifikanzniveau bei $p = 0,029$. Siehe Abbildung 32.

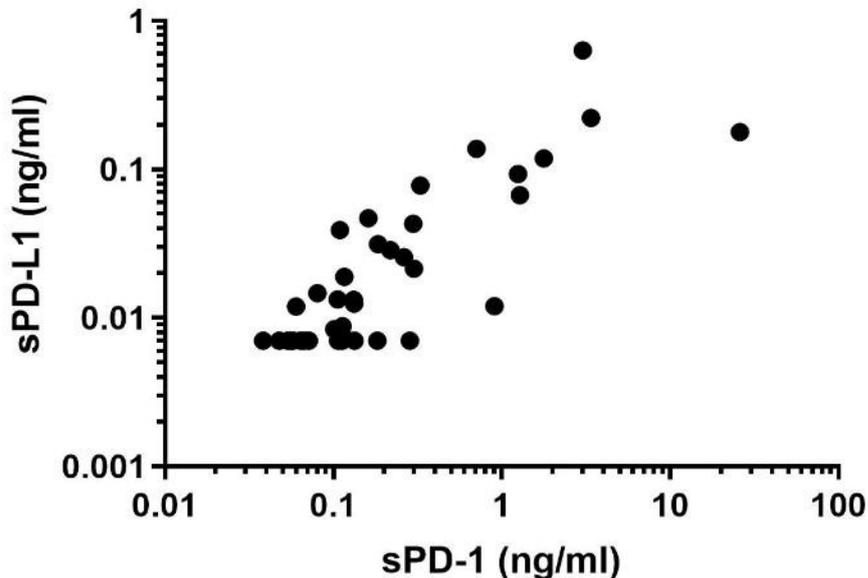


Abbildung 32: Korrelation zwischen den sPD-1 und sPD-L1 Serumwerten bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,34$; $p = 0,029$

sPD-1 = *Soluble programmed cell death protein 1*, sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*

3.10 Korrelation zwischen den sPD-L1 Serumwerten und der T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe beziehungsweise der PD-L1 Expression des Tumors

Bei 30 von 41 Patienten waren archivierte Tumorproben verfügbar. Gründe für das Fehlen der restlichen 11 Proben waren in 8 Fällen, dass die Diagnose des Pankreaskarzinoms in auswärtigen Institutionen erfolgte und in 3 Fällen, dass nach Diagnosestellung nicht mehr genug Tumormaterial für die geplanten immunhistochemischen Färbungen zur Verfügung stand. In 13 Fällen war Material aus dem Primarius verfügbar und in 17 Fällen aus Metastasengewebe. 2 Patienten hatten bereits Chemotherapie vor Entnahme der Tumorprobe erhalten. Siehe Tabelle 3.10.1.

Patienten- nummer	sPD-L1 Wert [ng/ml]	% PD-L1+ Pankreaskarzinomzellen	Tumorinfiltration von CD3+ T-Zellen	Typ des Tumorgewebes
1	0,013	0	1	Lebermetastase
2	0,007	zu wenig Tumorgewebe	-	-
3	0,012	5	1	peritoneal Metastase
4	0,138	externe Pathologie	-	-
5	0,007	10	1	Lebermetastase
6	0,007	externe Pathologie	-	-
7	0,007	0	2	peritoneal Metastase
8	0,007	30	1	Lebermetastase
9	0,007	0	2	Primarius
10	0,007	externe Pathologie	-	-
11	0,029	0	0	Lebermetastase
12	0,007	0	1	Lebermetastase
13	0,007	externe Pathologie	-	-
14	0,119	0	1	kutane Metastase
15	0,021	0	1	Lebermetastase
16	0,039	0	1	Primarius nach neoadjuvanter Chemotherapie
17	0,007	0	2	Primarius
18	0,007	20	0	Lebermetastase
19	0,043	30	1	Lebermetastase
20	0,009	0	1	Primarius
21	0,012	0	1	Primarius
22	0,007	0	2	Lebermetastase
23	0,632	externe Pathologie	-	-
24	0,007	0	1	Lebermetastase
25	0,007	externe Pathologie	-	-
26	0,078	30	2	Primarius
27	0,007	60	2	Primarius nach neoadjuvanter Chemotherapie
28	0,031	externe Pathologie	-	-
29	0,047	0	2	Lebermetastase
30	0,007	zu wenig Tumorgewebe	-	-
31	0,222	0	2	Primarius
32	0,013	0	1	Lebermetastase
33	0,008	zu wenig Tumorgewebe	-	-
34	0,015	20	1	Lebermetastase
35	0,067	0	2	Primarius
36	0,008	20	0	Lebermetastase
37	0,026	0	1	Primarius
38	0,178	externe Pathologie	-	-
39	0,012	0	1	Primarius
40	0,019	0	1	Primarius
41	0,093	0	2	Primarius

Tabelle 3.10.1 Übersicht der sPD-L1 Werte im Blut, der PD-L1 Expression im Tumorgewebe, der CD3+ T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe sowie der Art des Tumorgewebes

Es wurden nur CD3+ T-Zellen in unmittelbarer Nähe zu malignen Tumorzellen gezählt. Hierfür gilt:

0 = gering: ≤5 CD3+ T-Zellen, 1 = moderat: 6-50 CD3+ T-Zellen, 2 = hoch: > 50 CD3+ T- Zellen

sPD-L1 = *Soluble programmed death ligand 1*, PD-L1 = *Programmed death ligand 1*

Wie folgend angeführt wurde die Ausprägung der PD-L1 Expression des Tumors untersucht und anschließend überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression des Tumors und den sPD-L1 Werten des Bluts gibt. Außerdem wurde eine Untersuchung bezüglich der Ausprägung der Infiltration von CD3+ Zellen im Tumorgewebe durchgeführt. Anschließend wurde ebenfalls untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Infiltration von CD3+ Zellen und der sPD-L1 Werte im Blut gibt.

Die Tumorproben wurden auf ihre PD-L1 Expression untersucht. Als Positivkontrolle wurde die Tonsille gewählt und als Negativkontrolle diente die Leber. Unter Berücksichtigung dieser Kontrollen war die PD-L1 Expression in 9/30 Fällen positiv. Zur Veranschaulichung der PD-L1 Expression in Tumorgewebe dient Abbildung 33.

Beim Vergleich von sPD-L1 Serumwerten mit der Expression von PD-L1 in Tumorgewebe konnte keine positive Korrelation festgestellt werden (Abbildung 34).

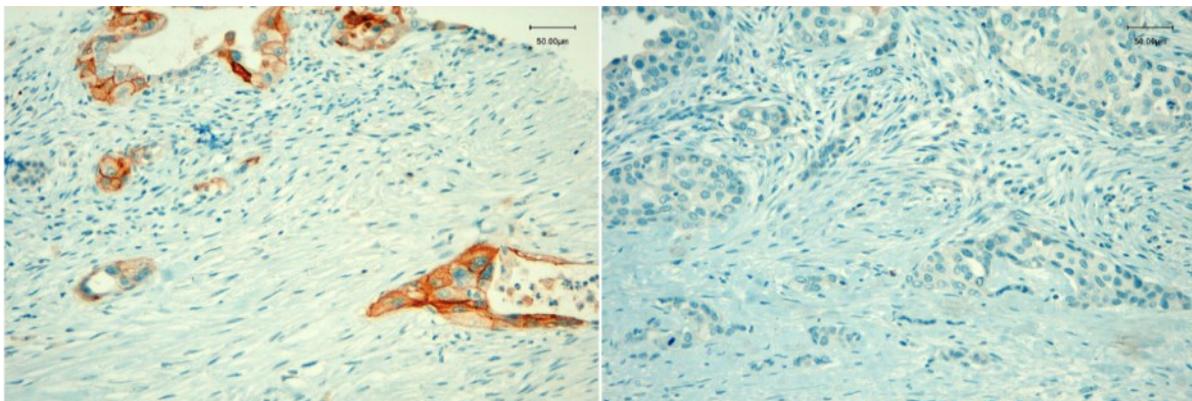


Abbildung 33: PD-L1 Expression im Tumorgewebe

links: Histologische Aufarbeitung einer Probe des Pankreaskarzinoms mit positiver PD-L1 Expression, welche als „stark“ klassifiziert wurde

rechts: Histologische Aufarbeitung einer Probe des Pankreaskarzinoms mit fehlender PD-L1 Expression

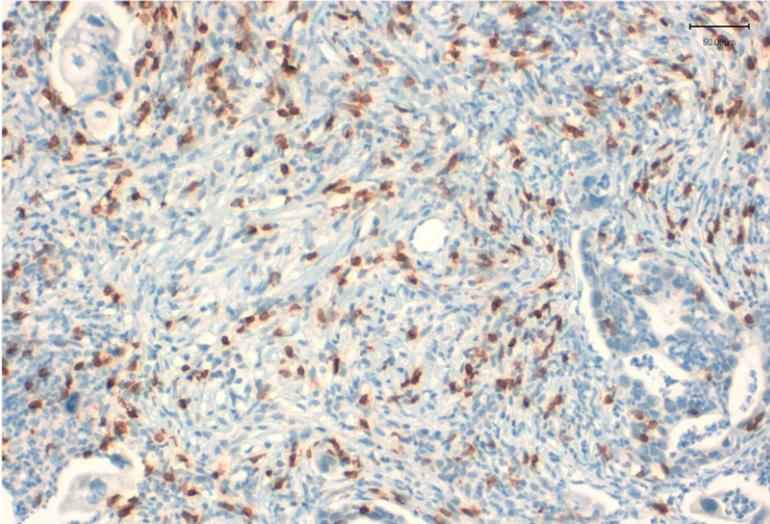


Abbildung 35: starke T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe

Starke CD3+ T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe, Score = 2

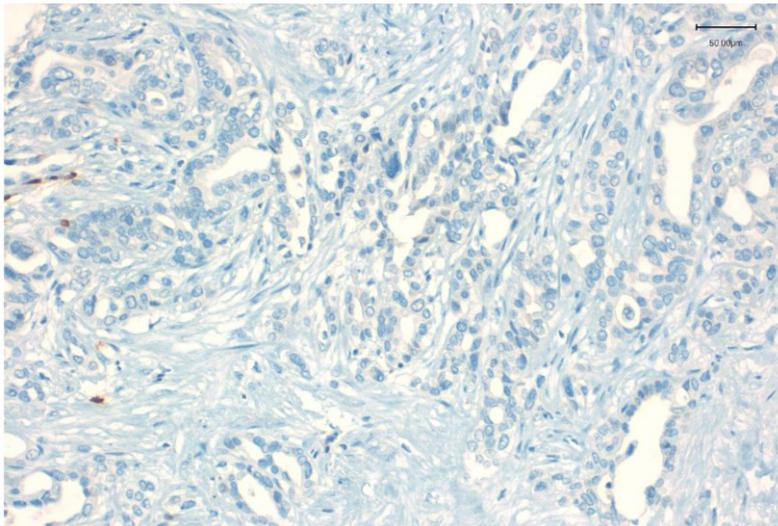


Abbildung 36: schwache T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe

Schwache CD3+ T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe, Score = 0

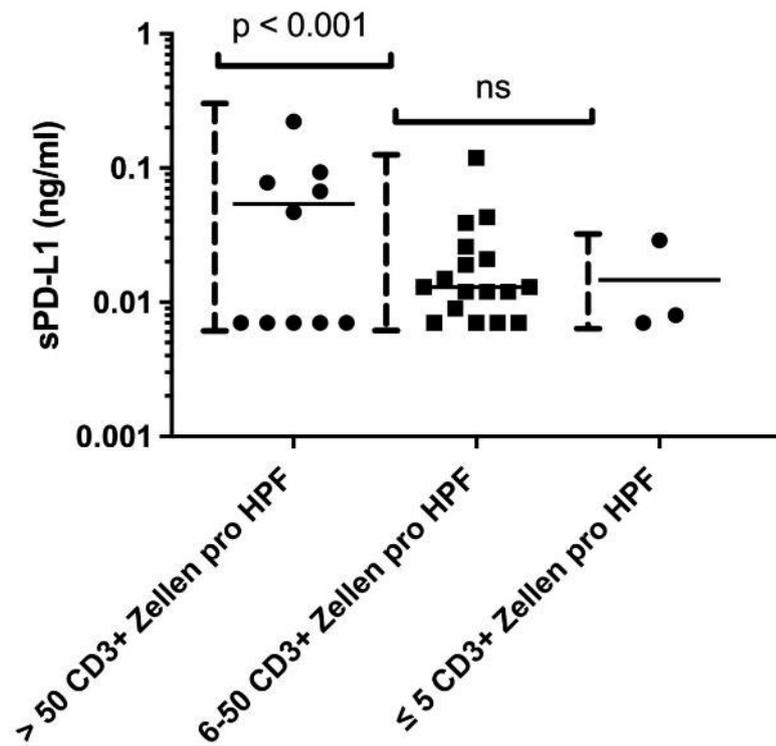


Abbildung 37: sPD-L1 Serumwerte in Abhängigkeit von der Anzahl CD3+ Zellen im Tumorgewebe

Vergleich von > 50 CD3+ Zellen pro HPF mit 6-50 CD3+ Zellen pro HPF:

t Test: $p = 0,09$; F-Test: $p < 0,001$

Vergleich von > 50 CD3+ Zellen pro HPF mit ≤ 5 CD3+ Zellen pro HPF:

t Test: $p = 0,35$; F-Test: $p = 0,07$

Vergleich von 6-50 CD3+ Zellen pro HPF mit ≤ 5 CD3+ Zellen pro HPF:

t Test: $p = 0,64$; F-Test: $p = 0,37$

sPD-L1 = Soluble programmed death ligand 1; HPF = High Power Field

3.11 Korrelation zwischen der PD-L1 Expression im Tumorgewebe und dem Gesamtüberleben

Auch der prognostische Stellenwert von PD-L1 Expression im Tumor von Patienten mit Pankreaskarzinom ist umstritten. Um zu untersuchen, ob das Ausmaß der PD-L1 Expression des Tumors eine Auswirkung auf das Überleben bei Pankreaskarzinompatienten hat, wurden zu der ausgesuchten aus 41 Patienten bestehenden sPD-1 und sPD-L1 Kohorte, welche ein fortgeschrittenes Pankreaskarzinom hat, weitere 36 Patienten ausgewählt, die ein initial resezierbares Pankreaskarzinom aufwiesen. Die Auswahl dieser Patienten erfolgte aufgrund zusätzlicher Färbung ihrer Tumorproben im Rahmen von anderen Studien aus der Datenbank „Der informative Patient“, bei der eine Aufarbeitung des Tumormaterials vollzogen wurde.

In dieser Kohorte waren bei Erstdiagnose 5 Patienten in einem lokal fortgeschrittenen Stadium, 25 Patienten wiesen bereits eine Metastasierung auf und 36 Patienten hatten ein Pankreaskarzinom, das als resektabel eingestuft wurde.

Die Anzahl der Zellen mit PD-L Expression wurden ermittelt und in 4 Stufen eingeteilt: keine, schwache, moderate und stark ausgeprägte PD-L1 Expression.

49 Patienten zeigten keine PD-L1 Expression im Tumorgewebe, 11 Patienten eine schwache PD-L1 Expression, 4 eine moderate PD-L1 Expression und bei 2 Patienten konnte die PD-L1 Expression als stark klassifiziert werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen der Gruppen 3 und 4 (moderate und starke Ausprägung) erfolgte eine Zusammenfassung dieser Gruppe zu „moderat/stark“.

Das mediane Gesamtüberleben der gesamten Studienpopulation lag bei 20,8 Monaten [95% KI 16,96 - 24,7]. Es wurde die Gesamtüberlebensrate abhängig von der Ausprägung der PD-L1 Expression untersucht.

Sowohl beim Vergleich von Gruppe 1 (keine Ausprägung) mit Gruppe 3 (moderate/starke Ausprägung) als auch beim Vergleich zwischen Gruppe 2 (leichte Ausprägung) mit Gruppe 3 (moderate/starke Ausprägung) zeigte sich jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$). Es konnte kein Unterschied im Überleben zwischen Gruppe 1 (keine Ausprägung) und Gruppe 2 (leichte Ausprägung) festgestellt werden.

Das mediane Überleben der PD-L1 negativen Patienten lag bei 21,0 Monaten [95% KI 17,3 - 24,7]. Die Patienten mit einer leichten PD-L1 Expression lebten im Median 25,1 Monate [95% KI 19,8 - 30,3] und jene mit einer moderaten/starken Expression 2,4 Monate [95% KI 0 - 7,5] (siehe Abbildung 38).

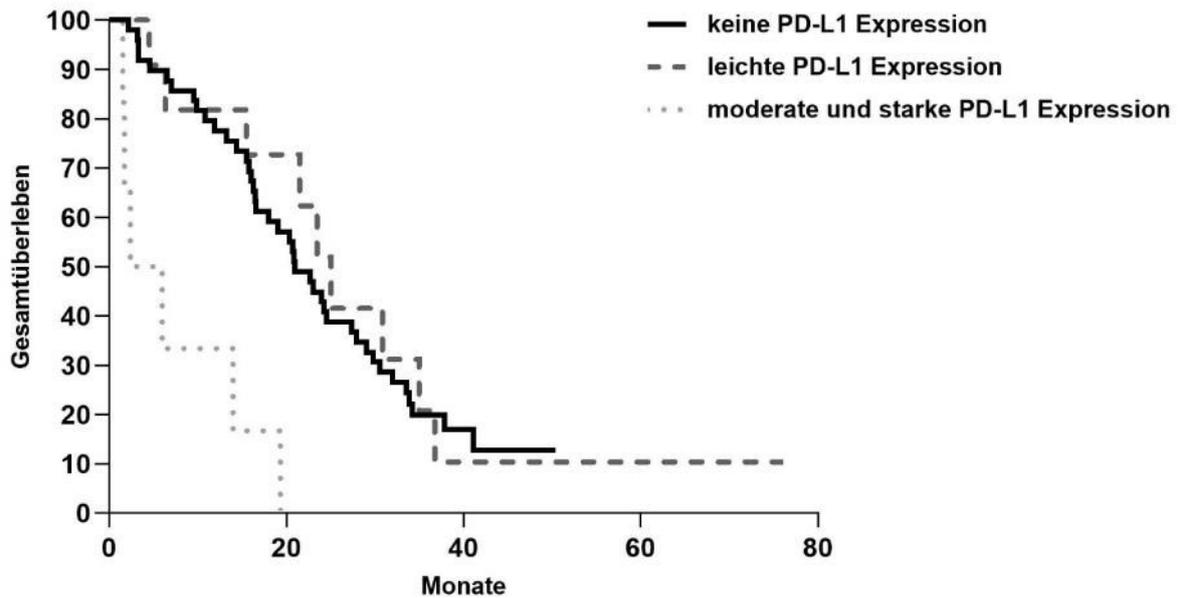


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve des Patientenkollektivs, bei dem die PD-L1 Expression im Tumorgewebe bestimmt wurde

Kaplan-Meier-Kurve als grafische Darstellung der Überlebensraten der Patienten ohne, leichter und moderater/starker PD-L1 Expression. Hierbei ist auf der X-Achse die Zeit in Monaten und auf der Y-Achse die Überlebensrate in Prozent eingetragen.

Log-Rank-Test: $p < 0,0001$

PD-L1 = *Programmed death ligand 1*

4 Diskussion

Der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin wurde im Jahr 2018 an James Allison und an Tasuku Honjo verliehen. Diese beiden Wissenschaftler widmeten ihre Forschung der Immun*checkpoint*blockade. Tasuku Honjo beschäftigte sich vor allem mit der therapeutischen Blockade von PD-1 und PD-L1 [39, 72]. PD-1 Inhibitoren haben bereits Einzug in die Behandlung zahlreicher solider Tumore gefunden [34]. Beim Pankreaskarzinom zeigte eine Monotherapie mit einem PD-1 Antikörper jedoch keine klinische Wirkung und auch im Zuge einer Kombinationstherapie profitieren die Patienten nicht von dieser Therapie [49, 50]. In Rahmen dieser Arbeit war das Ziel herauszufinden, ob lösliches PD-1 und lösliches PD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom im Blutserum nachweisbar ist und wie dieses entsteht. Zudem wurden Hypothesen über die Regulierung dieser Parameter aufgestellt und überprüft. Außerdem wurde auch untersucht, ob sPD-1 und sPD-L1 eine Aussage über die Prognose bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zulassen und sich folglich als immunologische Biomarker beim Pankreaskarzinom profilieren könnten.

4.1 Patientencharakteristika „Der informative Patient“ und der „sPD-1 und sPD-L1 Kohorte“

Die Patientencharakteristika der gesamten Studienpopulation „Der informative Patient“ sind bezüglich der Tumorhistologie, der Tumorlokalisation, des medianen Erkrankungsalters und der Geschlechterverteilung ein repräsentatives Kollektiv [1, 9, 14]. Das Erkrankungsstadium bei Erstdiagnose fällt im gesamten Studienkollektiv „Der informative Patient“ zugunsten einer initial kurativen Behandlungsmöglichkeit aus. In unserem Kollektiv haben sich 38,8% der Patienten einer Operation in kurativer Intention als Erstlinientherapie unterzogen. Dies ist am ehesten als Zentrumseffekt beziehungsweise Selektionsbias zu interpretieren. Aus der Literatur geht hervor, dass meist nur ein geringerer Prozentsatz der Patienten diese Therapieoption in Anspruch nehmen kann [73-75].

Für die Studienkohorte mit 41 Patienten wurden nur Patienten in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium aus dem Kollektiv „Der informative Patient“

ausgewählt, wenn von ihnen eine Blutprobe vor der palliativen Chemotherapie asserviert wurde und zur Bestimmung der sPD-1 und sPD-L1 Werte zur Verfügung stand. Diese Patienten wiesen ebenfalls typische Merkmale im Hinblick auf die oben genannten klinischen Charakteristika auf [1, 9, 14, 73].

4.2 Prognostische Relevanz von sPD-1, sPD-L1 und PD-L1 im Tumorgewebe

Das Pankreaskarzinom hat insbesondere im fortgeschrittenen Stadium eine infauste Prognose. Als prognostische Marker bei Patienten mit Pankreaskarzinom haben sich das Erkrankungsstadium, das Alter und der ECOG-Performance-Status bewährt. Sie dienen auch als Hilfe zur Entscheidungsfindung, welche Therapiemöglichkeiten für den erkrankten Patienten geeignet sind [1, 76]. Als biochemische, prognostisch ungünstige Marker gelten ein hohes CA 19-9 und CRP im Serum bei Therapiebeginn [18, 76, 77].

In vielen Tumorentitäten zeigen Therapien, die in den Immun*checkpoint*mechanismus von PD-1 und PD-L1 eingreifen, Erfolge [48]. Beim Pankreaskarzinom scheint eine Therapie mit solch einer Antikörpertherapie nicht zu einem Überlebensvorteil für den Patienten zu führen [50]. Zuzufolge der aktuellen S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom können Immuntherapien mit *Checkpoint*inhibitoren jedoch nach Ausschöpfen aller therapeutischen Optionen eingesetzt werden, wenn eine DNA *Mismatch*-Reparatur Defizienz beziehungsweise eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität vorliegt [78].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob eine Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom möglich ist und ob diese eine prognostische Relevanz haben. Zudem bestimmten wir auch die Expression von PD-L1 im Tumor bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und bei Patienten mit initial kurativ reseziertem Pankreaskarzinom und untersuchten auch hier, ob ein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben und der Expression von PD-L1 im Tumorgewebe zu beobachten ist.

In dieser Studie konnte sPD-1 in allen Serumproben nachgewiesen werden. Bei 15 der 41 Patienten war sPD-L1 unter der Nachweisgrenze. Es zeigte sich kein statistisch

signifikanter Unterschied betreffend das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben der Patienten bei Einteilung in Kohorten mit Serumwerten anhand von sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median. Auch eine prognostische Relevanz von sPD-1 und sPD-L1, welche mittels Cox'schen Regressionsmodell unter Einbeziehung bereits etablierter prognostischer Marker untersucht wurde, konnte nicht gezeigt werden.

sPD-1 und sPD-L1 wurden bereits als unabhängige prognostische Marker für verschiedene solide Tumorentitäten beschrieben. So zeigte sich beim hepatozellulären Karzinom und bei Patienten mit einem Karzinom der Lunge, dass hohe sPD-L1 Serumspiegel mit einem schlechten *Outcome* assoziiert sind [34, 42]. Bei Patienten mit einem NSCLC war zu beobachten, dass ein Ansteigen von sPD-1 unter der Therapie mit Erlotinib mit einem längeren progressionsfreien Überleben und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens assoziiert ist [79].

2019 veröffentlichten Bian et al. eine weitere Studie zu sPD-1, sPD-L1 und anderen löslichen Biomarkern beim Pankreaskarzinom. Widersprüchlich zu unseren Ergebnissen fanden sie eine prognostische Aussagekraft der beiden Biomarker. Sie stellten fest, dass hohe Plasma-Spiegel von sPD-1 und sPD-L1 mit einem schlechten *Outcome* im Sinne einer verkürzten Lebenserwartung bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom in fortgeschrittenem Stadium assoziiert sind. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die geringe Studienpopulationen beider Studien sein, die bei Bian et al. mit 32 Patienten ebenfalls klein ist. Zudem empfehlen die Autoren sPD-1 und sPD-L1 im Plasma zu messen, da bei ihren Untersuchungen die detektierbare Menge der Biomarker im Plasma zehn Mal höher war als im Serum [80].

Zudem erschien 2019 eine Studie von Park et al., welche die sPD-L1 Serumwerte bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zum Diagnosezeitpunkt und während der Therapie mit FOLFIRINOX untersuchte. Auch in dieser Studie konnte ein prognostischer Effekt von sPD-L1 gezeigt werden. Patienten mit initial hohem sPD-L1 zeigten ein schlechteres *Outcome* bezogen auf das Gesamtüberleben, als Patienten bei denen die sPD-L1 Werte im Serum vor Therapiebeginn niedrig waren. Außerdem deutete ein Absinken des sPD-L1 Werts unter Therapie auf ein gutes Ansprechen der Chemotherapie hin. In der Studienpopulation von Park et al. erhielten alle Probanden ein FOLFIRINOX Chemotherapie Schema, sodass von einer homogenen

Patientengruppe in sonst gutem Allgemeinzustand auszugehen ist [81]. Ein weiterer Grund für die diskrepanten Ergebnisse von Bian et al. und Park et al. könnten die unterschiedlichen herangezogenen Schwellenwerte sein. Momentan gibt es keine einheitlichen, etablierten *Cut-off*-Werte zur Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1 [82-86]. In unserer Studie wurde als Schwellenwert der Median und die 75. Perzentile der gesamten Patientenkohorte gewählt. In den oben zitierten Studien von Bian et al. und Park et al. wurde die Methode des *Receiver operating characteristic* (ROC) verwendet.

Folglich kann nach momentanem Wissensstand, anders als in unserer Studie gezeigt, eine prognostische Tendenz von sPD-L1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom vermutet werden. Für sPD-1 braucht es noch weitere Untersuchungen, um diesbezüglich eine Aussage treffen zu können. Ebenfalls sollte geklärt werden, ob eine Bestimmung der Werte in Plasma oder Serum erfolgen sollte. Es bleibt offen, ob sich sPD-L1 als immunologischer Biomarker beim Pankreaskarzinom etablieren wird. Jedenfalls sind noch weitere Studien notwendig um einheitliche Schwellenwerte für sPD-L1 und sPD-1 zu etablieren.

Eine prognostische Relevanz der PD-L1 Expression des Tumors beim Pankreaskarzinom ist bereits bekannt [87-89]. In unseren Analysen konnte bei den meisten der untersuchten Patientenfälle keine PD-L1 Expression nachgewiesen werden. Bei Patienten in einem initial fortgeschrittenen Stadium wiesen zirka 30% der Tumorproben eine PD-L1 Expression auf, bei Patienten mit resezierbarem Pankreaskarzinom bei Erstdiagnose waren es zirka 22%. In Hinblick auf das Gesamtüberleben konnte auch unsere Studie zeigen, dass eine ausgeprägte PD-L1 Expression mit einer schlechten Überlebensprognose einhergeht.

In der Studie von Nomi et al. wurde gezeigt, dass bei Patienten mit resezierbarem Pankreaskarzinom eine Expression von PD-L1 mit einem verkürzten Gesamtüberleben einhergeht. Mit Hilfe der Cox Regression zeigten sie, dass die PD-L1 Expression als unabhängiger prognostischer Marker fungiert [87]. Auch andere Forschungsgruppen zeigten einen prognostisch negativen Effekt auf den Krankheitsverlauf, bei vermehrter PD-L1 Expression [90]. Die Ausprägung der PD-L1 Expression scheint außerdem abhängig von der Wahl des verwendeten Antikörpers bei der immunhistochemischen Färbung und der Methode der Beurteilung zu sein [91], sodass hier noch eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse von untersuchten

Tumorproben notwendig ist, bevor die Bestimmung der PD-L1 Expression beim Pankreaskarzinom den Weg in den klinischen Alltag findet. Die prognostische Relevanz der PD-L1 Expression beim Pankreaskarzinom wurde meist bei Patienten untersucht, welche eine operative Therapie erhielten [92]. In unserer Studie hingegen wurde eine heterogene Gruppe von Patienten untersucht, in welcher die Patienten entweder in kurativer Intention operiert wurden oder sich bei Erstdiagnose in einem fortgeschrittenen Stadium befanden. Eine moderate beziehungsweise starke Expression von PD-L1 konnten wir lediglich bei Patienten in fortgeschrittenem Stadium feststellen. Es bleibt demnach auch noch offen, ob auch eine Bestimmung der PD-L1 Expression bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom in Zukunft vergleichbare Ergebnisse mit unseren Daten hervorbringen wird.

4.3 Entstehung und Regulation von sPD-1 und sPD-L1 in Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unseres Wissens sPD-1 und sPD-L1 erstmals bei Patienten mit Pankreaskarzinom bestimmt. Mittlerweile zeigten auch andere Arbeitsgruppen, dass eine Bestimmung von sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom nicht nur im Blutserum, sondern auch im Blutplasma möglich ist [80].

Unsere Gruppe untersuchte dabei auch, ob PD-L1 des Tumorgewebes den Ursprung von sPD-L1 darstellt. Es konnte zunächst einmal kein Zusammenhang zwischen der Höhe von sPD-L1 und der Ausprägung der PD-L1 Expression im Tumor festgestellt werden, sodass nicht davon auszugehen ist, dass das membrangebundene PD-L1 des Tumors den Ursprung der löslichen Form beim Pankreaskarzinom darstellt. Auch ein Zusammenhang zwischen der Tumorlast, welche durch die Surrogat-Parameter CA 19-9 und CEA gemessen wurden, und sPD-L1 konnte nicht gezeigt werden.

Ursprünglich wurde angenommen, dass sPD-L1 von Tumorzellen produziert wird [63, 93]. Es scheint allerdings wahrscheinlich, dass die Immunzellen der myeloiden Reihe, insbesondere reife dendritische Zellen, eine Quelle von sPD-L1 darstellen [63, 66]. Ruf et al. konnten – passend zu unseren Beobachtungen – ebenfalls keinen

Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression des Tumors und der Höhe des sPD-L1 beim klarzelligen Nierenzellkarzinom finden [94].

sPD-1 entsteht beim (alternativen) Spleißen von RNA [63]. Um mehr über den Ursprung und die Regulation von sPD-1 und sPD-L1 herauszufinden, korrelierten wir die beiden Parameter. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen sPD-1 und sPD-L1. Bian et al. konnten diesen Zusammenhang ebenfalls nachweisen [80]. Auch bei Autoimmunerkrankungen wurde eine Korrelation zwischen sPD-1 und sPD-L1 bereits beschrieben [71].

Diese Korrelation könnte auf einen gemeinsamen Ursprung von sPD-1 und sPD-L1 hindeuten. Außerdem lässt es vermuten, dass die Freisetzung von sPD-1 und sPD-L1 koinzident erfolgt und die beiden Parameter den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen.

4.4 CA 19-9 und CEA bei Patienten mit sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median

Um weitere Erkenntnis betreffend die prognostische Relevanz von sPD-1 und sPD-L1 zu erlangen und ob ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Tumorlast vorliegt, erfolgten Analysen, bei denen CA 19-9 und CEA als Surrogat-Parameter dienten.

CA 19-9 und CEA haben sich bereits als prognostische Tumormarker beim Pankreaskarzinom etabliert [1, 18, 70]. Hohe Werte von CA-19-9 und CEA gehen in der Regel mit einer höheren Tumorlast und einem schlechteren *Outcome* für den Patienten einher [18, 70]. Wie zu erwarten, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den beiden bereits etablierten Parametern. Die Mittelwerte von CA 19-9 beziehungsweise CEA in den Gruppen mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median und sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median zeigten keinen signifikanten Unterschied und auch eine Korrelationsanalyse der individuellen Patientenwerte mit CA 19-9 beziehungsweise CEA und sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 zeigte keinen Zusammenhang.

Diese Daten stimmen mit unserer Beobachtung überein, dass bei dieser Studie sPD-1 und sPD-L1 keine prognostische Relevanz aufwiesen und auch kein Zusammenhang zwischen sPD-L1 und der PD-L1 Expression des Tumors nachgewiesen werden konnte. Demnach weisen sPD-1 und sPD-L1 weder eine prognostische Relevanz auf, noch können sie als Parameter zur Bestimmung der Tumorlast herangezogen werden.

4.5 Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und den CRP Werten

CRP ist ein Akute-Phase-Protein und gilt als unspezifischer Parameter für Entzündungsreaktionen im Körper. Hier mit eingeschlossen sind unter anderem septische Krankheitsbilder sowie Entzündungsreaktionen, die im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankung stattfinden [77, 95]. Ein erhöhtes CRP beim Pankreaskarzinom steht im Zusammenhang mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern und scheint einen negativen prognostischen Parameter hinsichtlich des Gesamtüberlebens darzustellen [77].

Auch bei Autoimmunerkrankungen sind PD-1 und PD-L1 Gegenstand der Forschung. Als *Immunecheckpoint* haben PD-1 und PD-L1 wichtige Funktionen bei der Modifikation der Ausprägung der Immunantwort. Hierbei müssen T-Lymphozyten zwischen körpereigenen und fremden Merkmalen unterscheiden, um möglichst nur Pathogene zu eliminieren. Kommt es hierbei bei der T-Zellreifung zu keiner ausreichenden Selbsttoleranz, hängt die Immunantwort der T-Zellen von peripheren Regulationsmechanismen ab [96]. Die Rolle, welche der PD-1/-L1 Signalweg hierbei einnimmt, wurde bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen untersucht. Bei Autoimmunerkrankungen spielen chronische Entzündungsprozesse eine bedeutende Rolle [97]. Beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) wurden sPD-1 und sPD-L1 untersucht. Es zeigten sich erhöhte sPD-1 und sPD-L1 Serumwerte bei Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe dieser Parameter und dem Schweregrad der Erkrankung [98].

Bei unserer Studienkohorte konnten erhöhte sPD-1 und sPD-L1 Werte nur gemessen werden, wenn ebenfalls eine Erhöhung des Entzündungswerts CRP vorlag. Vergleichend hierzu gibt es eine Studie, die sPD-L1 bei Patienten mit hepatozellulärem

Karzinom (HCC) und Magenkarzinom untersuchte. sPD-L1 war bei diesen Patienten erhöht, wenn gleichzeitig eine systemische Entzündung vorlag. Eine systemische Entzündung wurde als Erhöhung von CRP oder sCD163 definiert [82, 99].

Folglich könnten sPD-1 und sPD-L1 beim Pankreaskarzinom auch als Indikatoren einer systemischen Inflammation zu werten sein.

4.6 Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Leukozytenzahl

sPD-1 und sPD-L1 sind lösliche Formen der kostimulatorischen Moleküle PD-1 und PD-L1. PD-1 wird von T-Zellen und kostimulatorischen B-Zellen exprimiert. Es wird davon ausgegangen, dass sPD-1 aus alternativ gespleißter mRNA entsteht [63]. Es ist umstritten, ob die lösliche Form von PD-L1 in der Lage ist an ihre membrangebundenen Formen zu binden [63]. Wäre dies jedoch der Fall, könnten hohe Werte von sPD-L1 mit einer erniedrigten Anzahl von T-Zellen im Blut einhergehen. Es wurde deshalb untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der sPD-1 und sPD-L1 Werte und der Leukozytenzahl besteht.

In unserer Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der sPD-1 und sPD-L1 Spiegel und der Leukozytenzahl im Blut bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom festgestellt werden. Es wurden sowohl die Mittelwerte der Leukozyten in Abhängigkeit vom Median von sPD-1 und sPD-L1 untersucht, als auch die Korrelation zwischen den individuellen Leukozytenwerten und den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Werten der Patienten.

In der Studie von Chen et al. wurde untersucht, wie sich die Höhe der sPD-L1 Werte im Serum von Patienten mit Autoimmunpankreatitis unter anderem auf die Leukozyten auswirkt. Sie konnten eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Anzahl der Lymphozyten und den sPD-L1 Werten zeigen. Zudem vermuten sie einen Zusammenhang zwischen Immundysfunktion und erhöhter sPD-L1-Expression [100]. Außerdem wurde von *in vitro* Versuchen berichtet, dass sPD-L1 zur Apoptose von T-Lymphozyten führt [66].

Diese Diskordanz zwischen den angeführten Studienergebnissen und den Ergebnissen unserer Studie könnte so erklärt werden, dass für die

Korrelationsrechnung in unserer Studie nicht die Lymphozytenzahl, sondern nur die Anzahl der gesamten Leukozyten zur Verfügung stand, da nach der Blutentnahme nur ein kleines Blutbild bestimmt wurde. Die Lymphozyten stellen normalerweise 25-45% der gesamten Leukozyten dar [101]. Auf die Neutrophilen, welche circa 50-75% der gesamten Leukozytenzahl ausmachen, scheint sPD-L1 keinen Effekt zu haben [101, 102].

4.7 Korrelation zwischen den sPD-1 beziehungsweise sPD-L1 Serumwerten und der Thrombozytenzahl

Thrombozyten spielen eine Rolle bei der hämatogenen Metastasierung von soliden Tumoren. Sie scheinen unter anderem einen Einfluss auf die Angiogenese des Tumors zu haben. Sobald die Tumorzellen in das Blutsystem eingedrungen sind, werden die Tumorzellen vor dem Immunsystem durch die Thrombozyten geschützt und fördern deren Anheftung an das Endothel der Blutgefäße [103]. Beim Pankreaskarzinom ist eine hohe Thrombozytenzahl mit einem schlechten *Outcome* für den Patienten assoziiert [103, 104]. Wang et al. fanden heraus, dass eine hohe prätherapeutische Thrombozytenzahl mit einer erhöhten Metastasierungsrate beim Pankreaskarzinom einhergeht [104]. Auch bei Pankreaskarzinompatienten mit synchronen Lebermetastasen geht ein erhöhter prätherapeutischer Thrombozytenwert mit einer schlechteren Prognose einher. Zudem zeigte sich, dass Patienten mit einem erhöhten mittleren Thrombozytenvolumen (MPV) vor Therapiebeginn ein signifikant kürzeres Überleben, verglichen mit Patienten mit normalen MPV, aufwiesen. Das MPV gibt Auskunft über die Aktivität der Thrombozyten im Blut [105]. Rolfes et al. untersuchten die PD-L1 Expression bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (HNSCC) im Blut und erkannten, dass auch Thrombozyten PD-L1 exprimieren. Hierbei zeigte sich auch, dass die PD-L1 Expression auf Thrombozyten bei der gesunden Kontrollgruppe deutlich geringer war als bei den erkrankten Patienten [106].

Momentan ist noch nicht bekannt, ob auch beim Pankreaskarzinom vermehrt PD-L1 an der Zelloberfläche von Thrombozyten exprimiert wird. Jedoch würde auch das PD-L1 der Thrombozyten eine Quelle für sPD-L1 darstellen. Hierbei zeigte sich bei unserer Kohorte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Höhe der

Thrombozytenzahl und der Menge an sPD-1 oder sPD-L1. Auch die Mittelwerte der Thrombozyten abhängig vom Median von sPD-L1 unterschieden sich nicht signifikant. Hingegen der Erwartungen zeigte sich sogar ein etwas niedrigerer Thrombozytenwert bei der Gruppe mit sPD-L1 \geq Median verglichen zu sPD-L1 $<$ Median.

4.8 Korrelation zwischen den sPD-L1 Serumwerten und der T-Zell Infiltration beziehungsweise der PD-L1 Expression im Tumorgewebe

Bei den Tumorproben, welche für diese Studie zur Verfügung standen, wurden die CD3+ T-Zell-Infiltration und die PD-L1 Expression untersucht. Zur Bestimmung der PD-L1 Expression im Tumorgewebe wurden zwei verschiedene PD-L1 immunhistochemische Antikörper benutzt. Allerdings konnte in der vorliegenden Studie die hohe PD-L1 Expression nicht bestätigt werden, welche in zuletzt veröffentlichten Studien gezeigt wurde [107]. Bei unseren Untersuchungen wurde nur eine Minderheit von 30% als PD-L1 positive Tumoren klassifiziert. Dies passt jedoch zu den Studienergebnissen von Nomi et al. sowie Wang et al., die ebenso bei rund einem Drittel, bis die Hälfte ihrer Kohorte eine positive PD-L1 Expression feststellen konnten [87, 90, 108]. Hier muss allerdings angemerkt werden, dass bis jetzt noch keine einheitlichen Richtwerte gefunden wurden, die eine PD-L1 Positivität definieren [34]. Die PD-L1 Expression könnte sich auch beim Pankreaskarzinom zwischen der Metastase und dem Primarius unterscheiden. Solch eine Diversität wurde bereits in Studien zur PD-L1 Expression beim Nierenzellkarzinom und dem Adenokarzinom der Lunge beschrieben [109-112]. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle hervorgehoben, dass der Großteil der Tumorproben unserer Kohorte aus Metastasen gewonnen wurde, nämlich 57%. Zuvor stattgefundene Untersuchungen zur PD-L1 Expression beim Pankreaskarzinom wurden ausschließlich bei Proben des Primarius gemessen [87, 90, 107, 108]. Bei Patienten mit Lymphomen wurde beobachtet, dass die sPD-L1 Werte im Blut unabhängig von der PD-L1 Tumorexpression sind [85, 113]. Vergleichend gab es auch bei unserer Untersuchung keine Korrelation zwischen der löslichen Form von PD-L1 und seinem membrangebundenen Pendant.

Bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der T-Zell Infiltration im Tumor und der sPD-L1 Werte im Blut, zeigte sich in einer Subgruppe von Patienten, die markant hohe sPD-L1 Werte im Blut aufwiesen, auch eine ausgeprägte CD3+ T-Zell

Infiltration im Tumorgewebe. Dies könnte darauf hinweisen, dass es eine Untergruppe eines inflammatorischen Tumors bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom geben könnte, die eine systemische Entzündungsreaktion und damit verbunden eine Erhöhung von sPD-L1 aufweist. Bei dieser Untersuchung war die Patientenzahl mit 41 erfassten Patienten sicherlich zu gering, um endgültige Schlüsse aus dieser Beobachtung zu ziehen. Deshalb sollten einige Studien folgen, die zum Ziel haben herauszufinden, warum es bei manchen Patienten mit starker CD3+ T-Zell-Infiltration zu einer Erhöhung von sPD-L1 im Blut kommt, wohingegen bei anderen diese Hochregulierung nicht erfolgt.

Laut der Studie von Balli et al. gibt es keine immungenetische Grundlage, welche eine Gruppe von inflammatorischen Pankreaskarzinom klassifiziert [114]. Das könnte erklären, warum bei unseren Messungen eine positive Korrelation zwischen hohen sPD-L1 Werten und einer starken CD3+ T-Zell-Infiltration beobachtet werden konnte, wohingegen keine Korrelation zwischen der Tumor PD-L1 Expression und den sPD-L1 Werten im Blut festgestellt werden konnte.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört zu einer der Tumorerkrankungen mit der höchsten Letalität. Aufgrund der unspezifischen Symptome wird diese Tumorerkrankung meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Zu den etablierten Therapien im fortgeschrittenen Stadium gehören Chemotherapieschemata basierend auf 5-Fluorouracil oder Gemcitabin. Therapien mit Immun*checkpoint*inhibitoren von CTLA-4, PD-1 und PD-L1 haben sich bereits bei anderen Tumorentitäten etabliert, Patienten mit einem Pankreaskarzinom scheinen nicht von solch einer Therapie zu profitieren. Die löslichen Formen der Immuncheckpoints PD-1 und PD-L1 (sPD-1 und sPD-L1) sind Gegenstand der Forschung diverser Tumorerkrankungen. In dieser Studie wurden sPD-1 und sPD-L1 beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom erstmals untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stellenwert der immunologischen Biomarker sPD-1 und sPD-L1 bei Patienten mit Pankreaskarzinom zu erforschen. Aus unseren Analysen konnte kein prognostischer Stellenwert dieser Parameter beim Pankreaskarzinom abgeleitet werden. Dies lässt sich aufgrund des fehlenden Unterschieds des Gesamtüberlebens, des progressionsfreien Überlebens und der fehlenden Korrelation zwischen den bereits etablierten Prognoseparametern festmachen. In einer anderen Studie mit ebenfalls geringen Patientenzahlen konnte jedoch eine prognostische Relevanz gezeigt werden. Folglich kann zusammengefasst werden, dass weitere prospektive Studien mit einer größeren Patientenzahl notwendig sind, um die prognostische Aussagekraft von sPD-1 und sPD-L1 zu evaluieren.

Interessanterweise können wir von einer Korrelation zwischen sPD-1 und sPD-L1 berichten. Dies könnte darauf hinweisen, dass sPD-1 und sPD-L1 den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen und koinzident ausgeschüttet werden. Hohe Werte von sPD-1 und sPD-L1 konnten außerdem nur bei Patienten mit einem erhöhten CRP Wert gemessen werden. Überdies hatten Patienten mit einer ausgeprägten T-Zell Infiltration im Tumorgewebe deutlich erhöhte sPD-L1 Werte im Serum, sodass in der Zusammenschau dieser beider Ergebnisse, sPD-1 und sPD-L1 unserer Meinung nach am ehesten Marker für systemische Entzündung darstellen. Eine Korrelation zwischen der Leukozytenzahl, der Thrombozytenzahl und sPD-1/sPD-L1 konnte nicht gezeigt werden.

Bisher ist wenig über den Ursprung von sPD-1 und sPD-L1 im Blut bekannt. Es ist davon auszugehen, dass sPD-1 ein Produkt alternativ gespleißter RNA ist und sPD-L1 aus einer proteolytischen Abspaltung der membrangebundenen Form entsteht. Andere Untersuchungen sind davon ausgegangen, dass der Ursprung von sPD-L1 der Tumor selbst sein könnte. Wir konnten allerdings keinen Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression des Tumors und seiner löslichen Form feststellen.

Beim Pankreaskarzinom stellt eine erhöhte PD-L1 Expression im Tumorgewebe einen negativen prognostischen Prädiktor dar. In dieser Arbeit konnte dieser Effekt ebenfalls gezeigt werden. Hierbei wurde zusätzlich zu der Patientengruppe mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom auch bei Patienten mit initial reseziertem Pankreaskarzinom die PD-L1 Expression untersucht.

Folglich kann zusammengefasst werden, dass aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse unserer Untersuchungen zu denen anderer Forschungsgruppen weitere prospektive Studien mit einer größeren Patientenzahl notwendig sind, um die prognostische Aussagekraft von sPD-1 und sPD-L1 beim Pankreaskarzinom zu eruieren. Weitere Studien benötigt auch unsere präliminäre Beobachtung, ob es möglicherweise einen inflammatorischen Subtyp des Pankreaskarzinoms gibt, welcher sich durch die alleinige sPD-L1 Erhöhung auszeichnet und unabhängig von der PD-L1 Expression des Tumors ist. Zusätzlich sollten zukünftige Studien klären, welche Immunzellen sPD-1 und sPD-L1 produzieren, was sie dazu triggert und welche funktionellen Konsequenzen daraus gezogen werden können. Letztlich ist das Ziel bei einer Krebsart mit solch schlechter Prognose ein besseres Verständnis der Tumorbilogie zu erhalten und damit eine bessere, individuellere Therapie für die Patienten anbieten zu können.

6 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei den Patienten bedanken, die ihre Einwilligung zur Durchführung dieser Studie gegeben haben. Ohne Menschen wie sie wäre eine Forschung und ein Weiterkommen in der Medizin kaum denkbar.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Böck, der mir das Thema dieser Doktorarbeit überlassen und in mir das Interesse für die Onkologie geweckt hat. Ich kann von Glück sprechen, ihn und PD Dr. Stephan Kruger damals in einem Kleingruppen-Tutorium an der Ludwig-Maximilians-Universität kennengelernt zu haben.

Herrn PD Dr. Stephan Kruger danke ich herzlich für die intensive und ausdauernde Betreuung sowie stetige Unterstützung und Einsatzbereitschaft beim Erstellen dieser Arbeit. Er ist mir immer mit seiner Fachkenntnis helfend und wohlgesonnen zur Seite gestanden.

Herrn PD Dr. med. Steffen Ormanns und auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Pathologischen Instituts der LMU München möchte ich meinen Dank für die Aufbereitung, Auswertung sowie Hilfestellung beim Beurteilen der Tumorproben aussprechen.

Bei Prof. Dr. Stefan Holdenrieder und seinem Team möchte ich mich für die Auswertung der Blutproben bedanken.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Medizinischen Klinik III dient mein Dank für die Rekrutierung und Asservierung von Patientenproben.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meiner engen Familie danken. Sie haben mich nicht nur liebevoll und stützend durch mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität begleitet, sondern sie sind auch immer hinter mir gestanden, haben mich motiviert und an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt. Nichts könnte ich tun oder sagen um dem, was sie für mich getan haben, gerecht zu werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Kamisawa, T., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2016. **388**(10039): p. 73-85.
2. Koch-Institut, R. and G.d.e.K.i.D. e.V., *Krebs in Deutschland 2015/2016*. 2019.
3. Herold, G., *Innere Medizin*. 2014, Köln.
4. Eskander, M.F., L.A. Bliss, and J.F. Tseng, *Pancreatic adenocarcinoma*. Current Problems in Surgery, 2016. **53**(3): p. 107-54.
5. Luttgies, J. and G. Kloppel, [*Pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursors*]. Pathologe, 2005. **26**(1): p. 12-7.
6. Wolfgang, C.L., et al., *Recent Progress in Pancreatic Cancer*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(5): p. 318-48.
7. Ryan, D.P., T.S. Hong, and N. Bardeesy, *Pancreatic Adenocarcinoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(11): p. 1039-1049.
8. Becker, A.E., et al., *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(32): p. 11182-98.
9. Ormanns, S., et al., *Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms*. Trillium Krebsmedizin, 2014. **23**(3): p. 110-115.
10. Koorstra, J.B., et al., *Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs)*. Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(4): p. 561-70.
11. Matthaei, H., et al., *Cystic precursors to invasive pancreatic cancer*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(3): p. 141-50.
12. Wood, L.D. and R.H. Hruban, *Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms*. Cancer J, 2012. **18**(6): p. 492-501.
13. Conrad, C. and C. Fernandez-Del Castillo, *Preoperative evaluation and management of the pancreatic head mass*. J Surg Oncol, 2013. **107**(1): p. 23-32.
14. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF) *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0*. 2013.
15. David, O., et al., *Pancreatic masses: a multi-institutional study of 364 fine-needle aspiration biopsies with histopathologic correlation*. Diagn Cytopathol, 1998. **19**(6): p. 423-7.
16. Swords, D.S., et al., *Biomarkers in pancreatic adenocarcinoma: current perspectives*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 7459-7467.
17. Ballehaninna, U.K. and R.S. Chamberlain, *The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(2): p. 105-19.
18. Haas, M., et al., *Prognostic value of CA 19-9, CEA, CRP, LDH and bilirubin levels in locally advanced and metastatic pancreatic cancer: results from a multicenter, pooled analysis of patients receiving palliative chemotherapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(4): p. 681-9.
19. Poruk, K.E., et al., *The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates*. Curr Mol Med, 2013. **13**(3): p. 340-51.
20. Wagner, M., et al., *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Br J Surg, 2004. **91**(5): p. 586-94.

21. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial*. *Jama*, 2013. **310**(14): p. 1473-81.
22. Furuse, J., [Adjuvant Chemotherapy after Surgery for Pancreatic Cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2016. **43**(2): p. 160-4.
23. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(25): p. 2395-2406.
24. Moore, M.J., et al., *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*, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
25. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
26. Heinemann, V., et al., *Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 82.
27. Dempke, W.C., et al., *Immunotherapies for NSCLC: Are We Cutting the Gordian Helix?* *Anticancer Res*, 2015. **35**(11): p. 5745-57.
28. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 329-60.
29. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. *Immunology*, 2007. **121**(1): p. 1-14.
30. Burnet, M., *Cancer—A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications*. *Br Med J*, 1957. **1**(5023): p. 841-7.
31. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
32. Iwai, Y., et al., *Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway*. *J Biomed Sci*, 2017. **24**.
33. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. *Am J Clin Oncol*, 2016. **39**(1): p. 98-106.
34. Wang, X., et al., *PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes*. *Onco Targets Ther*, 2016. **9**: p. 5023-39.
35. Dai, S., et al., *The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases*. *Cell Immunol*, 2014. **290**(1): p. 72-9.
36. Rowshanravan, B., N. Halliday, and D.M. Sansom, *CTLA-4: a moving target in immunotherapy*. *Blood*, 2018. **131**(1): p. 58-67.
37. Skelton, R.A., et al., *Overcoming the resistance of pancreatic cancer to immune checkpoint inhibitors*. *J Surg Oncol*, 2017. **116**(1): p. 55-62.
38. Royal, R.E., et al., *Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma*. *J Immunother*, 2010. **33**(8): p. 828-33.
39. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. *Embo j*, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
40. Dong, Y., Q. Sun, and X. Zhang, *PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(2): p. 2171-86.

41. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 219-42.
42. Nishimura, H., et al., *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 773-80.
43. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
44. Freeman, G.J., et al., *Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2223-7.
45. Salmaninejad, A., et al., *PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms*. Immunogenetics, 2018. **70**(2): p. 73-86.
46. van den Elsen, P.J., et al., *Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities*. Immunogenetics, 1998. **48**(3): p. 208-21.
47. Riley, J.L., *PD-1 signaling in primary T cells*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 114-25.
48. Syn, N.L., et al., *De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting*. Lancet Oncol, 2017. **18**(12): p. e731-e741.
49. Kruger, S., et al., *Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 268.
50. O'Reilly, E.M., et al., *Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2019. **5**(10): p. 1431-1438.
51. Marabelle, A., et al., *Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study*. J Clin Oncol, 2020. **38**(1): p. 1-10.
52. Boeck, S., et al., *Mismatch-repair-deficient metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma with a germline PALB2 mutation: unusual genetics, unusual clinical course*. Ann Oncol, 2017. **28**(2): p. 438-439.
53. Neesse, A., et al., *Stromal biology and therapy in pancreatic cancer*. Gut, 2011. **60**(6): p. 861-8.
54. Wang, L.M., et al., *The prognostic role of desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(4): p. 4183-94.
55. Watt, J. and H.M. Kocher, *The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration*. Oncoimmunology, 2013. **2**(12): p. e26788.
56. Fukunaga, A., et al., *CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas, 2004. **28**(1): p. e26-31.
57. Azuma, K., et al., *Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2014. **25**(10): p. 1935-40.
58. Mu, C.Y., et al., *High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation*. Med Oncol, 2011. **28**(3): p. 682-8.
59. Velcheti, V., et al., *Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer*. Lab Invest, 2014. **94**(1): p. 107-16.
60. Yang, C.Y., et al., *Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes*. Eur J Cancer, 2014. **50**(7): p. 1361-9.

61. Reck, M., et al., *Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(19): p. 1823-1833.
62. Powles, T., et al., *MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 558-62.
63. Zhu, X. and J. Lang, *Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(57): p. 97671-97682.
64. Chen, Y., et al., *Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1+ cell lines*. Cytokine, 2011. **56**(2): p. 231-8.
65. Nielsen, C., et al., *Alternative splice variants of the human PD-1 gene*. Cell Immunol, 2005. **235**(2): p. 109-16.
66. Frigola, X., et al., *Soluble B7-H1: Differences in production between dendritic cells and T cells*. Immunol Lett, 2012. **142**(0): p. 78-82.
67. Hamanishi, J. and I. Konishi, *[Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint signal - a new treatment strategy for cancer]*. Gan To Kagaku Ryoho, 2014. **41**(9): p. 1071-6.
68. Kruger, *Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer*. Oncoimmunology, 2017: p. e1310358.
69. Systems, R.D. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy1086.pdf>. 2019; Available from: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy1086.pdf>.
70. Haas, M., et al., *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, 2010. **31**(4): p. 351-7.
71. Yanaba, K., et al., *Serum levels of soluble programmed death-1 and programmed death ligand-1 in systemic sclerosis: Association with extent of skin sclerosis*. J Dermatol, 2016. **43**(8): p. 954-7.
72. NobelPrize.org, *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018*. 2018.
73. Gillen, S., et al., *Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages*. PLoS Med, 2010. **7**(4): p. e1000267.
74. Lee, E.S. and J.M. Lee, *Imaging diagnosis of pancreatic cancer: a state-of-the-art review*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(24): p. 7864-77.
75. Stathis, A. and M.J. Moore, *Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(3): p. 163-72.
76. Dell'Aquila, E., et al., *Prognostic and predictive factors in pancreatic cancer*. Oncotarget, 2020. **11**(10): p. 924-941.
77. Szkandera, J., et al., *Validation of C-reactive protein levels as a prognostic indicator for survival in a large cohort of pancreatic cancer patients*. Br J Cancer, 2014. **110**(1): p. 183-8.
78. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Kurzversion 2.0*. 2021.
79. Sorensen, S.F., et al., *Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib*. Lung Cancer, 2016. **100**: p. 77-84.
80. Bian, B., et al., *Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Oncoimmunology, 2019. **8**(4): p. e1561120.

81. Park, H., et al., *Prognostic implications of soluble programmed death-ligand 1 and its dynamics during chemotherapy in unresectable pancreatic cancer*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11131.
82. Finkelmeier, F., et al., *High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis*. Eur J Cancer, 2016. **59**: p. 152-159.
83. Zheng, Z., et al., *Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications*. Chin J Cancer Res, 2014. **26**(1): p. 104-11.
84. Wang, L., et al., *Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma*. Oncotarget, 2015. **6**(38): p. 41228-36.
85. Rossille, D., et al., *High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial*. Leukemia, 2014. **28**(12): p. 2367-75.
86. Takahashi, N., et al., *Serum levels of soluble programmed cell death ligand 1 as a prognostic factor on the first-line treatment of metastatic or recurrent gastric cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(8): p. 1727-38.
87. Nomi, T., et al., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
88. Birnbaum, D.J., et al., *Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(44): p. 71198-71210.
89. Zhuan-Sun, Y., et al., *Prognostic value of PD-L1 overexpression for pancreatic cancer: evidence from a meta-analysis*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 5005-5012.
90. Wang, L., et al., *Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma*. World J Surg, 2010. **34**(5): p. 1059-65.
91. Wang, X., et al., *PD-L1 is a direct target of cancer-FOXP3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and combined immunotherapy with antibodies against PD-L1 and CCL5 is effective in the treatment of PDAC*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020. **5**(1): p. 38.
92. Hu, Y., et al., *Prognostic value of PD-L1 expression in patients with pancreatic cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(3): p. e14006.
93. Frigola, X., et al., *Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(7): p. 1915-23.
94. Ruf, M., H. Moch, and P. Schraml, *PD-L1 expression is regulated by hypoxia inducible factor in clear cell renal cell carcinoma*. Int J Cancer, 2016. **139**(2): p. 396-403.
95. Vogt, B., et al., *CRP and the disposal of dying cells: consequences for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Autoimmunity, 2007. **40**(4): p. 295-8.
96. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 166-82.

97. Duan, L., X. Rao, and K.R. Sigdel, *Regulation of Inflammation in Autoimmune Disease*. J Immunol Res, 2019. **2019**: p. 7403796.
98. Du, Y., et al., *Serum levels of soluble programmed death-1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1(sPD-L1) in systemic lupus erythematosus: Association with activity and severity*. Scand J Immunol, 2020. **92**(1): p. e12884.
99. Kunk, P.R., et al., *From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 14.
100. Chen, Y., et al., *sPD-L1 Expression is Associated with Immunosuppression and Infectious Complications in Patients with Acute Pancreatitis*. Scand J Immunol, 2017. **86**(2): p. 100-106.
101. Hahn, J.-M., *Checkliste Innere Medizin*. Vol. 6. Auflage. 2006, Stuttgart Thieme.
102. Liu, M., et al., *Serum sPD-L1, Upregulated in Sepsis, May Reflect Disease Severity and Clinical Outcomes in Septic Patients*. Scand J Immunol, 2017. **85**(1): p. 66-72.
103. Gay, L.J. and B. Felding-Habermann, *Contribution of platelets to tumour metastasis*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 123-34.
104. Wang, H., et al., *The pretreatment platelet and plasma fibrinogen level correlate with tumor progression and metastasis in patients with pancreatic cancer*. Platelets, 2014. **25**(5): p. 382-7.
105. Yin, J.B., et al., *Mean platelet volume predicts survival in pancreatic cancer patients with synchronous liver metastases*. Sci Rep, 2018. **8**.
106. Rolfes, V., et al., *PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy*. Oncotarget. **9**(44): p. 27460-70.
107. Lu, C., et al., *The MLL1-H3K4me3 Axis-Mediated PD-L1 Expression and Pancreatic Cancer Immune Evasion*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(6).
108. Wang, Y., et al., *Prognostic value and clinicopathological features of PD-1/PD-L1 expression with mismatch repair status and desmoplastic stroma in Chinese patients with pancreatic cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(6): p. 9354-9365.
109. Callea, M., et al., *Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(10): p. 1158-64.
110. Uruga, H., et al., *Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(3): p. 458-466.
111. Jilaveanu, L.B., et al., *PD-L1 Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: An Analysis of Nephrectomy and Sites of Metastases*. J Cancer, 2014. **5**(3): p. 166-72.
112. Mansfield, A.S., et al., *Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(10): p. 1953-8.
113. Rossille, D., et al., *Soluble Programmed Death-Ligand 1 as a prognostic biomarker for overall survival in patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: a replication study and combined analysis of 508 patients*. Leukemia, 2017. **31**(4): p. 988-91.

114. Balli, D., et al., *Immune Cytolytic Activity Stratifies Molecular Subsets of Human Pancreatic Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(12): p. 3129-3138.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreas (G2), Quelle: Matthias Trummer	10
Abbildung 2: Cancer immunoediting, Quelle: Dempke et al. 2015 [27].....	13
Abbildung 3: Interaktion zwischen einer Tumorzelle und einer T-Zelle.....	18
Abbildung 4: Exemplarisches Bild eines Tissue microarrays, Quelle: Matthias Trummer	27
Abbildung 5: Immunhistochemische PD-L1 Färbung der Positiv- und Negativkontrolle	28
Abbildung 6: Lokalisation der Metastasen bei Beginn der palliativen Therapie des Patientenkollektivs „Der informative Patient“	31
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve des Kollektivs „Der informative Patient“	32
Abbildung 8: Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien zur Bestimmung der sPD-1 und sPD-L1 Stichprobe.....	34
Abbildung 9: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median	40
Abbildung 10: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median	41
Abbildung 11: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-1 < 75.Perzentile verglichen mit sPD-1 ≥ 75.Perzentile	42
Abbildung 12: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-L1 < 75.Perzentile verglichen mit sPD-L1 ≥ 75.Perzentile	43
Abbildung 13: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-1 < 1 ng/ml verglichen mit sPD-1 ≥ 1 ng/ml	44
Abbildung 14: Gesamtüberleben von Patienten mit sPD-L1 < 0,1 ng/ml verglichen mit sPD-L1 ≥ 0,1 ng/ml	45
Abbildung 15: Progressionsfreies Überleben seit der Erstdiagnose von Patienten mit sPD-1 < Median verglichen mit sPD-1 ≥ Median	46
Abbildung 16: Progressionsfreies Überleben seit der Erstdiagnose von Patienten mit sPD-L1 < Median verglichen mit sPD-L1 ≥ Median	47
Abbildung 17: Positive Korrelation zwischen den Tumormarkern CA 19-9 und CEA 50	
Abbildung 18: Mittelwerte von CA-19-9 bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD- L1 ≥ Median.....	51

Abbildung 19: Mittelwerte von CEA bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median.....	52
Abbildung 20: Korrelation zwischen individuellen CA 19-9 und sPD-L1 Werten.....	53
Abbildung 21: Korrelation zwischen individuellen CEA und sPD-L1 Werten	53
Abbildung 22: sPD-1 Mittelwerte bei normalem und erhöhtem CRP	55
Abbildung 23: sPD-L1 Mittelwerte bei normalem und erhöhtem CRP	56
Abbildung 24: Korrelation zwischen sPD-1 und Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose.....	58
Abbildung 25: Korrelation zwischen sPD-L1 und Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose.....	59
Abbildung 26: Mittelwerte der Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median.....	60
Abbildung 27: Mittelwerte der Leukozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median.....	61
Abbildung 28: Korrelation zwischen sPD-1 und Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose.....	63
Abbildung 29: Korrelation zwischen sPD-L1 und Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose	63
Abbildung 30: Mittelwerte der Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-1 < Median beziehungsweise sPD-1 ≥ Median.....	64
Abbildung 31: Mittelwerte der Thrombozyten im peripheren Blut bei Erstdiagnose bei sPD-L1 < Median beziehungsweise sPD-L1 ≥ Median.....	65
Abbildung 32: Korrelation zwischen den sPD-1 und sPD-L1 Serumwerten bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	66
Abbildung 33: PD-L1 Expression im Tumorgewebe	68
Abbildung 34: Korrelation zwischen den sPD-L1 Serumwerten und der PD-L1 Expression des Tumorgewebes	69
Abbildung 35: starke T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe.....	70
Abbildung 36: schwache T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe	70
Abbildung 37: sPD-L1 Serumwerte in Abhängigkeit von der Anzahl CD3+ Zellen im Tumorgewebe.....	71
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve des Patientenkollektivs, bei dem die PD-L1 Expression im Tumorgewebe bestimmt wurde	73

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.1 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs „Der informative Patient“	30
Tabelle 3.2.1 Klinische Charakteristika der sPD-1 und sPD-L1 Stichprobe.....	36
Tabelle 3.3.1 Vergleich der Patientencharakteristika von sPD-1 < Median mit sPD-1 ≥ Median.....	38
Tabelle 3.3.2 Vergleich der Patientencharakteristika von sPD-L1 < Median mit sPD-L1 ≥ Median.....	39
Tabelle 3.4.1 Prognostische Relevanz von sPD-1 und sPD-L1.....	48
Tabelle 3.10.1 Übersicht der sPD-L1 Werte im Blut, der PD-L1 Expression im Tumorgewebe, der CD3+ T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe sowie der Art des Tumorgewebes.....	67

10 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden bereits im Jahr 2017 in der Fachzeitschrift „Oncoimmunology“ veröffentlicht.

Stephan Kruger, Marie-Louise Legenstein, Verena Rösger, Michael Haas, Dominik Paul Modest, Christoph Benedikt Westphalen, Steffen Ormanns, Thomas Kirchner, Volker Heinemann, Stefan Holdenrieder & Stefan Boeck (2017)

Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer.

Oncoimmunology, 6:5, DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1310358>

11 Gender-Hinweis

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit und um den Lesefluss nicht zu stören, wurde in dieser Dissertation die männliche Form von „Patient“ in Singular und Plural gewählt. Dies soll keinesfalls eine Diskriminierung darstellen. Es sind alle Geschlechter gleichermaßen gemeint.

12 Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Legenstein, Marie-Louise

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Immunologische Biomarker beim Pankreaskarzinom:

Lösliches *Programmed cell death protein 1* und löslicher *Programmed death ligand 1* im Serum von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

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.

Wien, 12.12.2023

Marie-Louise Legenstein

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand