

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

Prognostischer Wert
serologischer Biomarker
bei Patienten mit Pankreaskarzinom

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

vorgelegt von

Miriam Charlotte Gerckens

aus

Troisdorf

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Böck
Mitberichterstatter:	PD Dr. Georg Beyer PD Dr. Steffen Tiedt
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. Stephan Kruger Dr. Klara Dorman
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	11.04.2024

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits im folgenden Fachartikel publiziert:

Dorman, K., Gerckens, M., Kruger, S. *et al.* Serum biomarker panel diagnostics in pancreatic ductal adenocarcinoma: the clinical utility of soluble interleukins, IFN- γ , TNF- α and PD-1/PD-L1 in comparison to established serum tumor markers. *J Cancer Res Clin Oncol* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04112-z>

This work is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	11
1.1 Pankreaskarzinom	11
1.2 Immunonkologie	13
1.3 Etablierte Tumormarker beim Pankreaskarzinom	14
1.4 Etablierte Tumormarker anderer Tumorentitäten	15
1.5 Cytokine IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 und TNF- α 16	
1.6 Das <i>Programmed Cell Death Protein 1</i> (PD-1) und sein Ligand 1 (PD-L1) ..	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material	19
3 Methoden	23
3.1 Studiendesign	23
3.2 Präanalytik	24
3.3 Analytik	24
3.3.1 Bestimmung der Tumormarker CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1 und HE4	24
3.3.2 Bestimmung inflammatorischer Cytokine	25
3.3.3 Bestimmung der löslichen Immun-Checkpoint Marker PD-1 und PD-L1 ...	25
3.4 Statistische Analysen	27
4 Ergebnisse	31
4.1 Klinische Charakteristika	31
4.2 Überlebenszeitanalysen	34

4.3	Biomarker mit Quantifikationsgrenzen und Verteilung.....	36
4.4	Korrelationen	38
4.5	Serumkonzentrationen der Biomarker	42
4.6	Prognostische Analysen	47
4.7	Prognostische Modelle	56
5	Diskussion.....	58
5.1	Repräsentativität des Studienkollektivs	58
5.2	Niedrige Serumlevel der Cytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p70 und IL-13	59
5.3	Korrelationen der Biomarker.....	60
5.4	Unterschiede der Serumkonzentrationen der Biomarker zwischen Patienten mit reseziertem, lokal fortgeschrittenem und metastasiertem Pankreaskarzinom.	61
5.5	Prognostische Analysen	61
5.6	Prognostische Modelle	64
6	Zusammenfassung.....	66
	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign	31
Abbildung 2: Therapien nach Studieneinschluss	33
Abbildung 3: Reversed Kaplan-Meier-Kurve mit <i>Follow-up</i> Rate in der Gesamtkohorte	35
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebenswahrscheinlichkeit in den Studiengruppen	36
Abbildung 5: Übersicht der Biomarker	37
Abbildung 6: Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen mit Darstellung normalisiert auf den Median	38
Abbildung 7: Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen mit Angabe der Messwerte logarithmiert zur Basis 10 und Darstellung normalisiert auf den Median	38
Abbildung 8: Korrelation von HE4-Serumkonzentration und Patientenalter	39
Abbildung 9: Korrelation von TNF- α -Serumkonzentration und Patientenalter	40
Abbildung 10: Darstellung des Korrelationskoeffizienten (R) nach Spearman zwischen Biomarker-Serumkonzentrationen mit hierarchischem Clustering als farbcodiertes <i>Heatmap</i> Diagramm	41
Abbildung 11: Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen in den drei Kohorten, dargestellt als Boxplot-Diagramm mit logarithmischer Darstellung der y-Achse	43
Abbildung 12: <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC)-Kurven und <i>Area under the curve</i> (AUC)-Analyse zur Darstellung möglicher Unterschiede der Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	45
Abbildung 13: <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC)-Kurven und <i>Area under the curve</i> (AUC)-Analyse zur Darstellung möglicher Unterschiede der Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und Patienten post Tumorresektion	46
Abbildung 14: Post Tumorresektion in kurativer Intention: <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC)-Kurven und Youden-Index für die Festlegung eines Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentration zur Unterscheidung von Patienten mit einer	

längeren oder kürzeren Überlebenszeit als das gruppenspezifische mediane Überleben.....	52
Abbildung 15: Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom: <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC)-Kurven und Youden-Index für die Festlegung eines Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentration zur Unterscheidung von Patienten mit einer längeren oder kürzeren Überlebenszeit als das gruppenspezifische mediane Überleben.....	53
Abbildung 16: Metastasiertes Pankreaskarzinom: <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC)-Kurven und Youden-Index für die Festlegung eines Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentration zur Unterscheidung von Patienten mit einer längeren oder kürzeren Überlebenszeit als das gruppenspezifische mediane Überleben	54
Abbildung 17: Cox-Regressionsmodell anhand einer Kombination der Serumkonzentrationen von CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PD-1 und PD-L1 zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom	56
Abbildung 18: <i>Random Forest</i> Modell anhand einer Kombination der Serumkonzentrationen von CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PD-1 und PD-L1 zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborinstrumente	19
Tabelle 2: Software.....	20
Tabelle 3: Reagenzien & Kits	20
Tabelle 4: Puffer & Lösungen	21
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial.....	21
Tabelle 6: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Serumprobenentnahme (n=162)	32
Tabelle 7: Chemotherapien nach Studieneinschluss.....	34
Tabelle 8: Zeitintervalle zwischen Tumorresektion, Serumprobenentnahme und Beginn der adjuvanten Chemotherapie	34
Tabelle 9: Quantifikationsgrenzen der Biomarker.....	36
Tabelle 10: Median mit Range (Min.-Max.) der Biomarker-Serumkonzentrationen ..	42
Tabelle 11: <i>Area under the curve</i> (AUC)-Werte mit 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) der <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC)-Kurven zur Darstellung möglicher Unterschiede der Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen den Studiengruppen	44
Tabelle 12: Prognostischer Wert klinischer Parameter bei Patienten post Tumorresektion in kurativer Intention	47
Tabelle 13: Prognostischer Wert klinischer Parameter bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	48
Tabelle 14: Prognostischer Wert klinischer Parameter bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom	48
Tabelle 15: Prognostischer Wert der Biomarker-Serumlevel bei Patienten post Tumorresektion in kurativer Intention	48
Tabelle 16: Prognostischer Wert der Biomarker-Serumlevel bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	49
Tabelle 17: Prognostischer Wert der Biomarker-Serumlevel bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom	49

Tabelle 18: Multivariate Analyse des prognostischen Wertes von CYFRA 21-1, IL-10 und <i>Grading</i> bei Patienten post Tumorresektion in kurativer Intention	50
Tabelle 19: Multivariate Analyse des prognostischen Wertes von CA 19-9 und IL-10 bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	50
Tabelle 20: Multivariate Analyse des prognostischen Wertes von CA 19-9, CEA und CYFRA 21-1 bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom	51
Tabelle 21: Koeffizienten der Biomarker im Cox-Regressionsmodell zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom.....	56
Tabelle 22: Gewichtung der Biomarker im <i>Random Forest</i> Modell.....	57

Abkürzungsverzeichnis

AUC	<i>Area under the curve</i>
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CYFRA 21-1	Cytokeratin-19-Fragment
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HE4	Humanes Epididymis Protein 4
HIF1A	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12p70	Interleukin-12p70
IL-13	Interleukin-13
LOQ	<i>Level of quantification</i>
LLOQ	<i>Lower level of quantification</i>
ULOQ	<i>Upper level of quantification</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
95 % CI	95 % Konfidenzintervall

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Beruhend auf den Daten der bevölkerungsbezogenen Krebsregistrierung erkrankten 2018 in Deutschland 19020 Menschen am Pankreaskarzinom. Da aufgrund der ungünstigen Prognose ein Langzeitüberleben mit diagnostiziertem Pankreaskarzinom eine Ausnahme darstellt, lagen die Sterbefälle im gleichen Jahr mit einer Anzahl von 18332 Menschen in der gleichen Größenordnung (Robert Koch-Institut 2021). Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 10 % weist das Pankreaskarzinom nach dem Mesotheliom die zweitniedrigste Überlebensrate unter den Tumorerkrankungen auf. Aufgrund der hohen Letalität gilt das Pankreaskarzinom als vierthäufigste Ursache unter den Krebssterbefällen (Robert Koch-Institut 2021).

Die epidemiologischen Daten aus den USA, veröffentlicht durch die *American Cancer Society*, zeigen ebenfalls eine 5-Jahres-Überlebensrate von 10 %. Auch in den USA stellt das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Krebstodesursache dar (Siegel et al. 2021).

Ursächlich für die hohe Letalität des Pankreaskarzinoms sind der aggressive Charakter und die frühe Metastasierung des Primärtumors sowie die häufig erst späte Diagnosestellung aufgrund fehlender spezifischer Frühsymptome. Mehr als die Hälfte der Pankreaskarzinome werden in Deutschland im metastasierten Stadium erstdiagnostiziert. Patienten mit einem Pankreaskarzinom im metastasierten Stadium haben eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von nur 2 % (Robert Koch-Institut 2021). Die USA weisen eine ähnliche Statistik auf mit einem Anteil der Erstdiagnosen im metastasierten Stadium von 52 % und einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 3 % in diesem Stadium (Siegel et al. 2021).

Die Metastasierung des Pankreaskarzinoms erfolgt per continuitatem in das retroperitoneale Gewebe, lymphogen, sowie hämatogen in erster Linie in die Leber, in zweiter Linie auch in andere Organe wie Lunge, Knochen oder Nebenniere. Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gelten Rauchen, exzessiver Alkoholkonsum, langjährige chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus Typ 2 und eine positive Familienanamnese (IARC WHO Classification of Tumours Editorial Board 2019; Klein 2021).

Mit dem Fortschreiten des Lebensalters nimmt die altersspezifische Erkrankungsrate kontinuierlich zu. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland beträgt bei Männern 72 Jahre, bei Frauen 76 Jahre (Robert Koch-Institut 2021).

Die histologische Klassifikation maligner Pankreastumore erfolgt anhand des ursprünglichen Zelltyps in das duktales Adenokarzinom, das Azinuszellkarzinom, neuroendokrine Tumore und weitere Subtypen. Das duktales Adenokarzinom stellt mit einem Anteil von nahezu 90 % den häufigsten histologischen Typ dar und ist in zwei Drittel der Fälle im Pankreaskopf lokalisiert (IARC WHO Classification of Tumours Editorial Board 2019).

Mögliche klinische Symptome wie abdominelle Beschwerden, Übelkeit, Erbrechen und Ikterus werden meist durch eine Kompression umliegender Strukturen verursacht und treten daher in vielen Fällen erst bei fortgeschrittener Tumorgroße auf (IARC WHO Classification of Tumours Editorial Board 2019).

Die Diagnostik beim Pankreaskarzinom umfasst die Abdomensonographie, Endosonographie, Computertomographie des Abdomens mit Kontrastmittel, Magnetresonanztomographie des Abdomens in Kombination mit einer Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatikographie sowie als zusätzliche *Staging*-Untersuchung die Computertomographie des Thorax. Die histologische Sicherung erfolgt mittels intraoperativer Probenentnahme im Falle eines primär resektablen Tumors beziehungsweise mittels Feinnadelbiopsie aus dem Primarius oder einer metastasensuspekten Läsion im Falle eines lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft 2021).

Das Stadium ist der wichtigste prognostische Faktor beim Pankreaskarzinom und bestimmt das therapeutische Vorgehen.

Die einzige potentiell kurative Therapie ist die chirurgische Resektion mit dem Ziel tumorfreier Resektionsränder (Wagner et al. 2004; Fusai et al. 2008; Hartwig et al. 2011). Die Resektion des Pankreaskopfkarcinoms wird in der Regel als partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt, bei Tumorlokalisation im Pankreaskörper und/oder Pankreasschwanz erfolgt eine Pankreaslinksresektion oder gegebenenfalls eine totale Duodenopankreatektomie. Die Lymphadenektomie soll gemäß S3-Leitlinie die Resektion von mindestens 12 regionären Lymphknoten umfassen (Deutsche Krebsgesellschaft 2021).

Die klinisch-pathologische Einteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation und der Zuordnung zum UICC-Tumorstadium. Entsprechend internationaler UICC-Klassifikation wird in der histopathologischen Aufarbeitung des Tumorresektats zwischen tumorfreien Resektionsrändern (R0), mikroskopischer Tumordinfiltration (R1) und makroskopischem Tumorresiduum (R2) unterschieden (Sobin L.H. 2009). Eine R0-Resektion ist mit einer deutlich verbesserten Prognose verbunden (Kaltenmeier et al. 2021).

Die Zuordnung zu den Tumordifferenzierungsgraden („*Grading*“) der dukalen Adenokarzinome erfolgt gemäß WHO-Klassifikation auf Grundlage der glandulären Formationen, Muzinproduktion, Mitoserate und Zellkernmerkmalen (Kloeppel G Berlin, 1996). Bei Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom ist eine signifikante Korrelation zwischen einem höherem *Grading* (zunehmend entdifferenziertem Tumorgewebe) und einem kürzeren Überleben beschrieben (Conroy et al. 2022). Ein weiterer prognostischer Faktor ist der bei Tumorpatienten erfasste *ECOG Performance Status* (Peixoto et al. 2015). Dieser ist eine numerische Skala zur Beurteilung des Allgemeinzustandes und wird beim Pankreaskarzinom in den Therapieempfehlungen mitberücksichtigt (Oken et al. 1982).

Nach chirurgischer Resektion eines Pankreaskarzinoms wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen (Oettle et al. 2007; Ueno et al. 2009). Der Standard in der adjuvanten Chemotherapie war lange Zeit eine Gemcitabin-Monotherapie basierend auf den Resultaten der CONKO-001 Studie (Oettle et al. 2007) und ESPAC-3 Studie (Neoptolemos et al. 2010). In der 2017 veröffentlichten ESPAC-4 Studie wurde die Überlegenheit einer adjuvanten Kombinationstherapie aus Gemcitabin plus Capecitabin gegenüber einer Gemcitabin-Monotherapie beschrieben (Neoptolemos et al. 2017). Kurz darauf konnte eine noch deutlichere Verbesserung des Gesamtüberlebens durch die Verwendung einer

Kombinationschemotherapie nach dem modifizierten FOLFIRINOX Protokoll (mFOLFIRINOX) gezeigt werden (Conroy et al. 2018). Daher gilt mFOLFIRINOX aktuell als Chemotherapeutikum der ersten Wahl bei Patienten mit einem guten Allgemeinzustand (ECOG 0-1). Aufgrund der höheren Toxizität des mFOLFIRINOX-Protokolls wird bei Patienten mit ECOG \geq 2 weiterhin eine Gemcitabin-Monotherapie oder Gemcitabin plus Capecitabin empfohlen.

Für die Beurteilung einer primären Resektabilität müssen neben anatomischen Gegebenheiten wie der Tumorausdehnung in Bezug auf die umliegenden Gefäße auch tumorbiologische Kriterien wie Lymphknotenmetastasen und präoperative CA 19-9-Werte und konditionale Kriterien des Patienten berücksichtigt werden (Khorana et al. 2016). Bei lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Tumoren ist eine Kombinationschemotherapie mit FOLFIRINOX oder Gemcitabin plus nab-Paclitaxel empfohlen mit dem Ziel einer anschließenden Resektion (Suker et al. 2016; Kunzmann et al. 2021).

In der palliativen Situation wird in den aktuellen Leitlinien eine Kombinationstherapie mit FOLFIRINOX oder Gemcitabin plus nab-Paclitaxel für Patienten mit ECOG 0-1 empfohlen. Bei Patienten mit ECOG \geq 2 oder einer Komorbidität, welche kein aggressiveres Therapieregime erlaubt, besteht die Therapieempfehlung in einer Monotherapie mit Gemcitabin (gegebenenfalls in Kombination mit Erlotinib) (Sohal et al. 2018). Auch wenn die Entwicklung der beschriebenen Kombinationstherapien wie FOLFIRINOX und Gemcitabin plus nab-Paclitaxel mit einem verlängerten medianen Überleben der Patienten einhergeht, ist die Prognose des metastasierten Pankreaskarzinoms nach wie vor ungünstig.

1.2 Immunonkologie

Das Immunsystem ist in der Lage tumorspezifische Antigene frühzeitig zu erkennen und Tumorzellen zu eliminieren. Daran beteiligt sind unter anderem zytotoxische CD8+ T-Zellen, T-Helfer-Zellen, dendritische Zellen, sowie natürliche Killerzellen (Zou 2005).

Mittlerweile werden Mechanismen, mithilfe derer sich ein Tumor der Detektion durch das Immunsystem entzieht, als zentraler Bestandteil der Karzinogenese angesehen (Hanahan and Weinberg 2011). Erkenntnisse aus Mausmodellen legen nahe, dass immunsuppressive Zellen wie regulatorische T-Zellen, myeloische Suppressorzellen und tumorassoziierte Makrophagen bereits früh in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms eine Rolle spielen. Sie infiltrieren die Tumorumgebung (Clark et al. 2007) und gehen mit dem Fortschreiten der Erkrankung einher (Hiraoka et al. 2006; Zhao et al. 2009). Zudem zeigen tumorassoziierte Makrophagen während der Tumorentwicklung eine zunehmende Polarisierung von proinflammatorischen M1-Zellen zu immunsuppressiven M2-Zellen. Dies begünstigt die immunologische Tumortoleranz (Schmieder et al. 2012; Siveen and Kuttan 2009). Die für die Tumormunität essenziellen CD8+ T-Zellen und natürlichen Killerzellen zeigen im Stroma des Pankreaskarzinoms häufig eine herabgesetzte Aktivität (Hiraoka et al. 2006; Fincham et al. 2021).

Die Initiation der T-Zell-Aktivierung nimmt in der effektiven Immunantwort eine zentrale Rolle ein. Hierfür ist zusätzlich zur Bindung eines MHC-Moleküls der Antigen-präsentierenden Zelle an den T-Zell-Rezeptor die Bindung von Liganden an co-stimulierende Rezeptoren wie CD40L, OX40, CD27, 4-1BB oder CD28 auf der T-Zell-Oberfläche essenziell. Neben den co-stimulierenden Rezeptoren werden auf aktivierten T-Zellen die Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 exprimiert, welche bei Bindung der Liganden

CD80/86 und PD-L1/PD-L2 die weitere Aktivierung der T-Zelle hemmen (Sideras et al. 2014). Eine Expression von PD-L1 zeigt sich bei verschiedenen Tumorentitäten. *In-vitro*-Untersuchungen legen eine durch PD-L1 bedingte Apoptose von aktivierten tumorantigen-spezifischen T-Zellen nahe (Dong et al. 2002). Pankreaskarzinomzellen und Zellen der Mikroumgebung können durch die Sekretion von Cytokinen wie IL-10 und die Expression immunologischer Oberflächenmoleküle wie PD-L1 zum immunsuppressiven Milieu beitragen (Sideras et al. 2014).

1.3 Etablierte Tumormarker beim Pankreaskarzinom

Tumormarker können bei verschiedenen Fragestellungen Anwendung finden: diagnostische Tumormarker dienen der Erkennung von Neuerkrankungen, Rezidiven oder Krankheitsprogression. Tumormarker mit prognostischer Wertigkeit ermöglichen eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder die Überlebenswahrscheinlichkeit. Prädiktive Tumormarker sind mit dem Tumoransprechen auf spezifische Therapien assoziiert (Winter, Yeo, and Brody 2013).

Das **Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9)** wurde erstmals im Jahr 1979 in Kolonkarzinom-Zellen durch monoklonale Antikörper (1116-NS-19-9) identifiziert (Koprowski et al. 1979) und ist heute der am besten untersuchte und klinisch am häufigsten eingesetzte Tumormarker beim Pankreaskarzinom (Tempero et al. 2017). Zum Screening asymptomatischer Menschen ist CA 19-9 aufgrund eines niedrigen positiv prädiktiven Wertes nicht geeignet (Ballehaninna and Chamberlain 2012). Bei symptomatischen Patienten wird die diagnostische Wertigkeit von CA 19-9 von den meisten Expertengruppen ebenfalls als begrenzt eingeschätzt (Duffy et al. 2010; Ducreux et al. 2015).

Auch in der Diagnostik von Rezidiven bei Patienten mit primär reseziertem Pankreaskarzinom ist der Nutzen von CA 19-9 limitiert. In einer Übersichtsarbeit wurde eine Sensitivität von 68-89 % und eine Spezifität von 77-89 % für die Detektion eines Rezidivs durch postoperativ routinemäßig durchgeführte CA 19-9-Messungen beschrieben (Daamen et al. 2018). Zudem ist eine Assoziation zwischen einer CA 19-9-basierten Früherkennung eines Rezidivs und einem verlängertem Überleben nicht belegt. Das *National Comprehensive Cancer Network* stuft die serologische Bestimmung von CA 19-9 in der Tumornachsorge daher lediglich als Kategorie 2B Empfehlung ein (Tempero et al. 2017). Auch die *American Society of Clinical Oncology* bewertet CA 19-9-Messungen in der postoperativen Nachsorge als fakultativ (Khorana et al. 2016). Die Europäische Gesellschaft für Medizinische Onkologie sowie die deutsche S3-Leitlinie empfehlen nach kurativer Resektion lediglich eine symptomorientierte klinische Nachsorge (Ducreux et al. 2015; Deutsche Krebsgesellschaft 2021).

Hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit von CA 19-9 konnte bei Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom eine Assoziation zwischen hohen CA 19-9-Konzentrationen und einer kürzeren Überlebenszeit gezeigt werden (Kondo et al. 2010; Hata et al. 2012). Auch bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom ist CA 19-9 als prognostischer Marker vielfach beschrieben (Maisey et al. 2005; Louvet et al. 2005; Hess et al. 2008; Boeck et al. 2010).

Limitationen von CA 19-9 als Tumormarker sind insbesondere die fehlende CA 19-9-Synthese von Patienten mit dem Phänotyp (a-b-) der Lewis-Blutgruppe (Tempero et al. 1987) und falsch hohe CA 19-9-Konzentrationen bei Vorliegen einer Cholestase (Tsen, Barbara, and Rosenkranz 2018).

Das **Carcinoembryonale Antigen (CEA)** wurde erstmals an humanen Kolonkarzinomzellen beschrieben (Gold and Freedman 1965). Es wird bereits im fetalen Gastrointestinaltrakt gebildet und wird auch beim erwachsenen Mensch physiologisch in geringen Mengen von Zellen des Gastrointestinaltrakts, des Pankreas und der Leber exprimiert (Holdenrieder and Stieber 2019). Erhöhte Serumkonzentrationen sind für diverse maligne Erkrankungen beschrieben (Hirai 1977). Beim kolorektalen Karzinom korrelieren hohe CEA Serumlevel bei Diagnosestellung mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Cooper et al. 1979) und einer ungünstigen Prognose (Park et al. 2009; Thirunavukarasu et al. 2011).

Beim Pankreaskarzinom ist CEA als diagnostischer Tumormarker untersucht: eine Metaanalyse von Meng et al. zeigte eine gepoolte Sensitivität von 0,43 (95 % CI 0,39-0,47) und eine Spezifität von 0,82 (95 % CI 0,79-0,84) von CEA für die Diagnosestellung eines Pankreaskarzinom. Hinsichtlich der Rolle von CEA als prognostischen Marker ist hier zudem eine signifikante Assoziation von hohen CEA-Serumkonzentrationen mit einem kürzeren Überleben (HR 1,43, 95 % CI 1,31-1,56) beschrieben (Meng et al. 2017). Dahingegen zeigte eine Untersuchung von 291 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom lediglich eine signifikante Assoziation der prätherapeutischen CEA-Serumkonzentration mit der Zeit bis zum Tumorprogress, jedoch nicht mit dem Gesamtüberleben (Haas et al. 2013).

1.4 Etablierte Tumormarker anderer Tumorentitäten

CYFRA 21-1 ist ein serumlösliches Fragment von Cytokeratin 19, einem in epithelialen Zellen diverser Organe vorkommenden Zellskelettprotein. Es wird freigesetzt von nekrotischen oder apoptotischen Zellen und wurde als serologischer Marker bei verschiedenen Tumorentitäten untersucht (Omary et al. 2009). Als diagnostischer Tumormarker beim Lungenkarzinom wurde CYFRA 21-1 erstmals im Jahr 1993 beschrieben (Stieber et al. 1993) und gilt inzwischen auch als prognostischer und prädiktiver Tumormarker beim nicht-kleinzelligen fortgeschrittenem Lungenkarzinom (Edelman et al. 2012; Holdenrieder et al. 2017).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten die prognostische Relevanz von CYFRA 21-1 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom: Eine Studie mit 78 Patienten zeigte eine signifikante Korrelation von prätherapeutischen CYFRA 21-1-Werten und der Überlebenszeit. Auch mittels seriellen Messwerten während Erstlinien-Chemotherapie konnte CYFRA 21-1 als Prädiktor für das Gesamtüberleben identifiziert werden (Boeck et al. 2013). Eine weitere prospektive Studie mit 59 Patienten bestätigte die Korrelation von prätherapeutischen CYFRA 21-1-Werten mit dem Gesamtüberleben (Haas et al. 2015).

Das **Human Epididymis Specific Protein 4 (HE4)** wurde zunächst in epithelialen Zellen des Nebenhodengangs identifiziert (Kirchhoff et al. 1991). Inzwischen ist eine Expression des Proteins im gesunden menschlichen Gewebe mehrfach nachgewiesen. Es kommt unter anderem in den Epithelien der zentralen Atemwege sowie einiger Reproduktionsorgane, in Speicheldrüsen, der Schilddrüse und der Niere vor (Bingle, Singleton, and Bingle 2002; Drapkin et al. 2005; Galgano, Hampton, and Frierson 2006). Bei malignen Erkrankungen wird HE4 eine begünstigende Rolle in der Tumorentwicklung, Chemotherapieresistenz und Metastasenbildung zugeschrieben (James, Chichester, and Ribeiro 2018).

So bewirkt HE4 beispielsweise über eine Aktivierung des STAT3-Signalweges die Überexpression pro-angiogenetischer Proteine wie IL-8 und HIF1A (hypoxia-inducible factor 1-alpha) (James et al. 2020). Am besten ist HE4 beim Ovarialkarzinom untersucht: Eine Überexpression des codierenden Gens bei Patienten mit Ovarialkarzinom wurde von Schummer et al. bereits im Jahr 1999 beschrieben (Schummer et al. 1999). Wenige Jahre später wurde im Serum gemessenes HE4 als diagnostischer Marker beim Ovarialkarzinom identifiziert (Hellstrom et al. 2003). Inzwischen konnten prospektive Studien belegen, dass HE4 bei Patientinnen mit pelvinen Raumforderungen als serologischer Marker zur Risikostratifizierung des Vorliegens eines Ovarialkarzinoms verwendet werden kann (Moore et al. 2008; Holcomb et al. 2011; Karlsen et al. 2012).

Beim Pankreaskarzinom zeigen Genexpressionsanalysen signifikant erhöhte mRNA-Level in maligne entartetem Pankreasgewebe verglichen mit Nachbargewebe und immunhistochemische Untersuchungen eine signifikant höhere HE4-Proteinexpression in Tumorgewebe verglichen mit benachbartem Gewebe und Pankreasgewebe von gesunden Probanden. Interessanterweise ist zudem eine inverse Korrelation zwischen der Proteinexpression im Gewebe und dem klinischen Stadium mit hoher HE4-Expression in frühem Tumorstadium beschrieben (Huang et al. 2015). Während eine Studie mit 220 Gewebeproben von 172 Patienten keine Assoziation zwischen der HE4-Expression im Tumorgewebe und dem Überleben aufwies (O'Neal et al. 2013), beschrieben Ohkuma et al. nach Untersuchungen an Pankreaskarzinomgewebe von 80 Patienten eine erhöhte HE4-Expression als in der multivariaten Analyse unabhängigen Faktor für ein geringes Überleben (Ohkuma et al. 2021).

Serologische Untersuchungen zu HE4 bei Patienten mit Pankreaskarzinom zeigten signifikant erhöhte Werte sowohl im Vergleich zu gesunden Kontrollen als auch zu Kontrollen mit benignen Pankreaserkrankungen (Faca et al. 2008; Brand et al. 2011; Huang et al. 2015). Unseres Wissens wurde die Assoziation zwischen HE4 im Serum bei Patienten mit Pankreaskarzinom und dem Überleben bisher nicht untersucht.

1.5 Cytokine IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 und TNF- α

Cytokine sind regulatorische Proteine mit vielfältigen Wirkungen auf die Differenzierung von Zellen und auf Kontrollmechanismen des Immunsystems. Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert, aktivieren nach Bindung an Membranrezeptoren ihrer Zielzellen intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden und beeinflussen so die Genexpression der Zielzelle. Die Wirkung ist abhängig vom Cytokin, der Zielzelle und dem Vorhandensein weiterer Cytokine mit synergistischen oder antagonistischen Effekten. So bewirkt das gleiche Cytokin an unterschiedlichen Zielzellen unterschiedliche Effekte (Pleiotropie) und verschiedene Cytokine können durch Nutzung der gleichen Rezeptoren das gleiche Signal auslösen (Redundanz), wodurch ein komplexes regulatorisches Netzwerk entsteht (Schooltink and Rose-John 2003).

Eine Überexpression diverser Cytokine beim Pankreaskarzinom (Bellone et al. 2006) begünstigt die Tumorentwicklung durch direkte Effekte auf die Tumorzellen und immunmodulierende Wirkung in der Tumorumgebung (Roshani, McCarthy, and Hagemann 2014). Eine Assoziation hoher Serumkonzentrationen inflammatorischer Cytokine mit einem schlechteren Überleben ist insbesondere für IL-6 und IL-10 beschrieben (Ebrahimi et al. 2004; Farren et al. 2016). Jedoch beschreiben einzelne

Studien auch für diverse andere Cytokine eine Assoziation mit der Prognose (Dima et al. 2012; Mitsunaga et al. 2013; Piro et al. 2017), sodass die Frage zur prognostischen Wertigkeit von Cytokinen bei Patienten mit Pankreaskarzinom nicht abschließend geklärt ist.

1.6 Das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) und sein Ligand 1 (PD-L1)

Das PD-1 Gen wurde erstmals bei *in-vitro*-Experimenten an einem die Apoptose durchlaufenden T-Zell Hybridom im Jahr 1992 identifiziert (Ishida et al. 1992). PD-1 wird von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert, der Ligand PD-L1 von einer Vielzahl von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen. Die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 wirkt inhibitorisch auf die Aktivierung von T-Lymphozyten und trägt damit zur Immuntoleranz bei (Schildberg et al. 2016).

Beim Pankreaskarzinom korreliert eine hohe Expression von PD-L1 im Tumorgewebe mit einer reduzierten T-Zell-Infiltration im Tumor, einer schlechteren Prognose des Patienten (Nomi et al. 2007), einer geringeren Differenzierung und einem fortgeschrittenen Stadium des Tumors (Geng et al. 2008).

In die Interaktionen zwischen Tumorzellen und Immunzellen einzugreifen ist das Grundprinzip der Immuntherapie in der Onkologie. Eine Strategie zur Modifikation des Immunsystems bei Tumorerkrankungen ist die Disinhibition der T-Zell-Aktivierung durch die Blockade von Rezeptor-Ligand-Interaktionen, wie beispielsweise von PD-1/PD-L1 (Sideras et al. 2014). Ein Beispiel hierfür ist die PD1-Blockade durch den monoklonalen Antikörper Pembrolizumab. Pembrolizumab ist in den Therapieempfehlungen diverser solider Tumore wie dem Melanom und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom enthalten (Flynn and Gerriets 2022). In den USA ist Pembrolizumab zur Behandlung des Pankreaskarzinoms als Zweitlinientherapie bei zusätzlichem Vorliegen einer Mismatch-Reparatur-Defizienz bzw. einer hochgradigen Mikrosatelliteninstabilität empfohlen und zugelassen (Sohal et al. 2018), während in Europa in dieser Situation gegenwärtig keine Zulassung besteht.

Neben der membrangebundenen Form existieren PD-1 und PD-L1 auch als lösliche Proteine. Es wird angenommen, dass lösliches PD-1 hauptsächlich durch selektives Splicen von PD-1 mRNA entsteht (Nielsen et al. 2005), während lösliches PD-L1 durch die proteolytische Abspaltung von membrangebundenem PD-L1 durch endogene Matrixmetalloproteasen entsteht (Dezutter-Dambuyant et al. 2016; Hira-Miyazawa et al. 2018). Die biologische Aktivität der löslichen Isoformen ähnelt denen der membrangebundenen Form. Lösliches PD-1 blockiert den Rezeptor PD-L1, führt aber zugleich zu einer Hemmung der T-Zellaktivierung, wobei ein *Reverse signaling* als zugrundeliegender Mechanismus angenommen wird (Kuipers et al. 2006). Lösliches PD-L1 bindet wie die membrangebundene Form an PD-1 (Hassounah et al. 2019).

Lösliche Formen von PD-1 und PD-L1 im Serum wurden erstmals bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen beschrieben (Nielsen et al. 2005; Wan et al. 2006). Bei Patienten mit Malignomen wie Lungenkarzinom, Magenkarzinom oder hepatozellulärem Karzinom wurde mehrfach eine Korrelation zwischen einer Erhöhung der Serumlevel von löslichem PD-L1 und einem schlechteren klinischen Outcome beschrieben (Okuma et al. 2017; Takahashi et al. 2016; Finkelmeier et al. 2016). Bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom konnte unsere Arbeitsgruppe bisher keine Korrelation von PD-1 und PD-L1 Serumkonzentrationen mit dem klinischen Outcome zeigen (Kruger et

al. 2017). Es stellte sich jedoch die Frage, zu welchem Ergebnis eine Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv kommt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund von Limitationen der beim Pankreaskarzinom etablierten Tumormarker CA 19-9 und CEA sind weitere Biomarker mit prognostischer Aussagekraft von großem Interesse. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom die prognostische Wertigkeit serologischer Biomarker bezogen auf das Gesamtüberleben an einer retrospektiven Patientenkohorte zu untersuchen. Hierzu wurden klinische Daten und Serumproben von 162 Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom untersucht. Bestimmt wurden dabei die beim Pankreaskarzinom etablierten Tumormarker (CA 19-9, CEA), etablierte Tumormarker anderer Tumorentitäten (CYFRA 21-1, HE4), Cytokine (IFN- γ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α) sowie lösliche Immun-Checkpoint Marker (PD-1, PD-L1).

Zentrale Fragestellung:

- Besteht bei den untersuchten Biomarkern eine Korrelation zwischen der Serumkonzentration und dem Gesamtüberleben bei Patienten mit reseziertem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom, sodass daraus eine prognostische Aussagekraft der Biomarker beim Pankreaskarzinom abzuleiten wäre?

Weitere Fragestellungen:

- Wie ist die Verteilung der untersuchten Biomarker unter Berücksichtigung der Quantifikationsgrenzen?
- Besteht eine Korrelation der Serumkonzentrationen zwischen den verschiedenen Biomarkern im paarweisen Vergleich?
- Bestehen Unterschiede bezüglich der Serumkonzentrationen zwischen den Patientengruppen und welches Diskriminationspotenzial besitzen die Biomarker?
- Lassen sich für die Biomarker *Cut-off*-Werte ermitteln, welche anhand der Biomarker-Serumkonzentration eine Zuordnung der Patienten zu verschiedenen prognostischen Gruppen erlauben?

2 Material

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die verwendeten Laborinstrumente (Tabelle 1), Software (Tabelle 2), Reagenzien & Kits (Tabelle 3), Puffer & Lösungen (Tabelle 4) sowie das Verbrauchsmaterial (Tabelle 5).

Tabelle 1: Laborinstrumente

Produkt	Hersteller
Zentrifuge	
Allegra X-30R Centrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Platten-Schüttler	
Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Germany
BioShake iQ	Quantifoil Instruments GmbH, Jena, Deutschland
ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Messinstrumente	
Kompaktwaage CS-Serie 200g	Ohaus corporation, Parsippany, USA
Timer ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einkanal-Pipetten	
Eppendorf Research plus, Einkanal, 0,5- 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus, Einkanal, 10- 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus, Einkanal, 100- 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus, Einkanal, 0,5- 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanal-Pipetten	
Eppendorf Explorer, 8-Kanal, 5- 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Explorer, 8-Kanal, 50- 1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Explorer, 12-Kanal, 50- 1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlung	
Kühlschrank	Skyport GmbH, Amberg, Deutschland

Gefrierschrank -20°C

Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen,
Deutschland

Gefrierschrank -80°C

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Protein-Analyse

Cobas e 411 Analyzer

Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz

Mesoscale Quickplex SQ120

Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA

Tabelle 2: Software

Produkt	Hersteller
Discovery Workbench 4.0	Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA
Microsoft Excel 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA
IBM SPSS Statistics 27	IBM, Armonk, USA

Tabelle 3: Reagenzien & Kits

Produkt	Hersteller
Elecsys® CA 19-9	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Elecsys® CEA	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Elecsys® CYFRA 21-1	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Elecsys® HE4	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
V-PLEX Plus Proinflammatory Panel 1 Human Kit	Meso Scale Diagnostics, Rockville, USA
Human PD-1 DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human PD-L1/B7-H1 DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
ROTI®Cell PBS, ROTI®Cell 10x PBS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Albumine Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Diluent 2	Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA

Diluent 3	Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA
MSD SULFO-TAG Labeled Streptavidin	Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA
MSD Gold Read Buffer A	Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA

1x *Phosphate buffered saline* (PBS) wurde aus ROTI®Cell 10x PBS und deionisierten Wasser hergestellt.

Tabelle 4: Puffer & Lösungen

Produkt	Hersteller
Waschpuffer	0,05 % (V/V) TWEEN®20 in <i>Phosphate buffered saline</i>
Blockierungsreagenz	5 % (m/V) Albumine Fraktion V in <i>Phosphate buffered saline</i>
Verdünnungsmittel	1 % (m/V) Albumine Fraktion V in <i>Phosphate buffered saline</i>

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
MESO Quickplex 96-well Standard Plate Plate Pack	Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, USA
ELISA <i>Plate Sealers</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
S-Monovette® Serum, 7,5ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nunc™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen	
15 ml	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
50 ml	
Microcentrifuge tubes with lid closure	
0,5 ml	
1,5 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
2,0 ml	
Reaction vials	
5,0 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Pipettenspitzen

0,5- 10 μ l

10- 100 μ l

100- 1000 μ l

0,5- 10 ml

BRAND GMBH+CO KG, Wertheim, Germany

Pipettenspitzen

50- 1250 μ l

Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Reagent Reservoir 100ml

VWR International, West Chester, USA

Pipetting Reservoir 25ml

Argos Technologies, Rungis, Frankreich

3 Methoden

3.1 Studiendesign

In die Datenbank des Studienprojektes „Der Informative Patient - Evaluation des Ansprechens auf eine Tumortherapie bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren anhand klinischer, laborchemischer und genetischer Faktoren“ wurden konsekutiv Patienten aufgenommen, welche zwischen den Jahren 2011 und 2020 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München mit gastrointestinalen Tumoren diagnostiziert und/oder behandelt wurden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München genehmigt (Ethikvotum LMU München Nr.: 284-10). Alle Studienteilnehmer stimmten schriftlich der Archivierung und Untersuchung von Blutproben und Tumorgewebe sowie der Erhebung und Archivierung von klinischen Daten der Krankheitsgeschichte bezogen auf den gesamten Krankheitsverlauf zu.

Für die vorliegende Untersuchung wurden Patienten der Datenbank mit diagnostiziertem Pankreaskarzinom ($n=321$) anhand folgender Kriterien in die drei Kohorten eingeteilt:

Einschlusskriterien:

- Kohorte „Post Tumorresektion in kurativer Intention“:
Patienten nach Resektion eines lokal begrenzten Pankreaskarzinoms in kurativer Intention mit Beginn einer adjuvanten Chemotherapie innerhalb von 30 Tagen nach Studieneinschluss.
- Kohorte „Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom“:
Patienten mit Erstdiagnose eines lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms und Beginn einer Chemotherapie innerhalb von 30 Tagen nach Studieneinschluss. Als lokal fortgeschritten eingeordnet wurden primär nicht resektable Pankreaskarzinome ohne Nachweis von Fernmetastasen.
- Kohorte „Metastasiertes Pankreaskarzinom“:
Patienten mit Erstdiagnose eines metastasierten Pankreaskarzinoms und Beginn einer Chemotherapie innerhalb von 30 Tagen nach Studieneinschluss. Diese Kohorte umfasste Patienten mit bei Studieneinschluss synchron metastasiertem Pankreaskarzinom sowie Patienten, welche vorausgehend bei initial operablem Pankreaskarzinom in kurativer Intention behandelt worden waren (Tumorresektion und gegebenenfalls adjuvante Chemotherapie) und bei Studieneinschluss im Rahmen eines Tumorrezidivs ein metachron metastasiertes Pankreaskarzinom aufwiesen. Eine gemeinsame Betrachtung in derselben Studiengruppe ist gemäß aktueller Studienlage beim Pankreaskarzinom berechtigt (Hashimoto et al. 2009). Eine palliative Systemtherapie war vor Studieneinschluss bei keinem der Patienten durchgeführt worden.

Ausschlusskriterien:

- Es waren keine Serumproben verfügbar.
- Die präanalytische Probenvorbereitung war ungeeignet.
- Bei Studieneinschluss lag die synchrone Diagnose eines Zweitmalignoms vor.

Die erhobenen Daten und Serumproben der Studienteilnehmer wurden für die Messungen der Biomarker-Serumkonzentrationen und die statistische Auswertung pseudonymisiert.

Die in der Auswertung berücksichtigten klinischen Parameter beziehen sich auf den Zeitpunkt der Serumprobenentnahme und umfassen Alter, Geschlecht, *ECOG Performance Status*, Tumorlokalisation, Tumorphistologie, Datum und Substanzen der ersten Chemotherapie nach Serumprobenentnahme sowie Überleben nach Studieneinschluss. Bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom wurde außerdem die Metastasierungsart zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (synchron vs. metachron) erhoben, sowie bei resezierten Patienten das Datum der Tumorresektion, das UICC-Stadium nach pTNM nach der 7. Version (Sobin L.H. 2009), der Resektionsstatus und das *Grading* des Tumorresektats.

Die Erfassung der klinischen Daten und die Überprüfung des Überlebensstatus der Studienteilnehmer erfolgte retrospektiv mittels der dem LMU Klinikum vorliegenden Befunde, insbesondere Arztbriefe, Operationsberichte, histologische Befunde, Tumorkonferenzdokumentation und Chemotherapie-Pläne. Bei unvollständigen Daten erfolgte zudem die Konsultation der nachsorgenden Onkologen, der betreuenden Hausärzte und des zuständigen Standesamts. Das Follow-up erfolgte bis zum 31.01.2020. Für die Überlebenszeitanalysen wurde das zensierte Überleben verwendet, definiert als Zeitraum von der Serumprobenentnahme bis zum Tod jedweder Ursache oder dem letztem Follow-up.

3.2 Präanalytik

Nach Einschluss in die Studie erfolgte eine venöse Blutentnahme mittels Serumröhrchen durch das Forschungspersonal der Arbeitsgruppe Onkologie (Leitung: Prof. Dr. V. Heinemann). Nach anschließender Zentrifugation des Vollblutes für 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute (U/min) bei Raumtemperatur wurde das Serum am selben Tag abpipettiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren, die längerfristige Lagerung erfolgte bei -80°C im LMU Klinikum.

3.3 Analytik

3.3.1 Bestimmung der Tumormarker CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1 und HE4

Die quantitative Bestimmung der Tumormarker CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1 und HE4 im Serum erfolgte anhand der Elektrochemilumineszenz-Immunoassays Elecsys® durch den Cobas e 411 Analyzer. Diese Messungen erfolgten am Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrum München durch qualifizierte labortechnische Assistenz und qualitätskontrolliert nach der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung labormedizinischer Untersuchungen.

Hierbei wurden 10 µl Serum mit biotinyliertem und mit ruthenyliertem Antikörper gegen Epitope des jeweiligen Tumormarkers zur Ausbildung von Sandwich-Komplexen für 9 Minuten inkubiert. Es folgte eine erneute Inkubation von 9 Minuten mit Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln und letztlich die Messung mittels Elektrochemilumineszenz-Reaktion. Die vom Hersteller festgelegten Messbereiche der Assays betragen 0,600-1000 U/ml für CA 19-9, 0,200-1000 ng/ml für CEA, 0,10-500 ng/ml für CYFRA 21-1 und 15-1500 pmol/l für HE4.

Bei Proben mit CA 19-9-Konzentrationen oberhalb der Messgrenze von 1000 U/ml wurde eine 1:10 Verdünnung des Serums durchgeführt und bei Bedarf in einem weiteren Schritt eine erneute 1:10 Verdünnung, sodass der Messbereich für CA 19-9 durch die seriellen Verdünnungen bis 100000 U/ml erweitert werden konnte.

3.3.2 Bestimmung inflammatorischer Cytokine

Die Cytokine IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 und TNF- α wurden unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Multi-Spot Assay mittels Mesoscale Quickplex SQ 120 gemessen. Aufgrund der begrenzten Materialmenge der Serumproben entschieden wir uns für die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Multi-Spot-Assay. Während die Messungen der oben genannten Tumormarker im Rahmen der laborchemischen Routine erfolgten, wurden die experimentellen Multi-Spot Assay am Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrum München eigenständig durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog zu den Herstelleranweisungen, wobei bei der zweifachen Verdünnung von Proben und Kontrollen die „*Dilute in Plate*“- Methode angewendet wurde.

Kurz gefasst erfolgte nach dreifachem Waschen die Zugabe von 50 μ l Standard in der Standardreihe. Entsprechend der „*Dilute in Plate*“- Methode mit 1:1 Mischung wurden nach dem Auftragen von 25 μ l Verdünnungslösung 25 μ l der Kontrollen und Proben hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte mit 700 U/min und dreimaligem Waschen wurden 25 μ l der Detektions-Antikörper-Lösung hinzugegeben und erneut für 120 Minuten bei Raumtemperatur und 700 U/min inkubiert. Die Platte wurde dreifach gewaschen, pro Well wurde 150 μ l zweifach konzentrierter Read Buffer T als Katalysator der Elektrochemilumineszenz-Reaktion hinzugegeben und die Elektrochemilumineszenz der Wells wurde unmittelbar durch den Mesoscale Quickplex SQ 120 vermessen. Die Datenanalyse erfolgte durch die Software Discovery Workbench 4.0.12.

In der Analyse der Messergebnisse wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Quantifikationsgrenzen berücksichtigt.

3.3.3 Bestimmung der löslichen Immun-Checkpoint Marker PD-1 und PD-L1

Die Konzentrationen der löslichen Isoformen der Proteine PD-1 und PD-L1 im Serum wurden mittels Sandwich-ELISA unter Verwendung der Human DuoSet ELISA Development Kits bestehend aus monoklonalen Antikörpern und rekombinatem Proteinstandard bestimmt. Die Durchführung dieses neu etablierten Assays erfolgte eigenständig, die laborinterne Validierung der Messmethode erfolgte gemeinsam mit Kimberly Krüger (Krueger, Mayer, Gerckens, et al. 2022; Krueger, Mayer, Kottmaier, et al. 2022).

Die Quickplex 96-well Standard Platte wurde mit 100 μ l einfachem *Phosphate buffered saline* (PBS) pro Well inkubiert und bei 700 U/min für 5 Minuten geschüttelt. Diese Vorbehandlung der Mikrotiterplatte mit PBS diente dem Befeuchten der Standardplatte mit seinen hydrophoben Oberflächeneigenschaften zum Schaffen besserer Bedingungen für das Bindungsverhalten des Capture-Antikörpers. Nach dem Ausschlagen der Platte auf Zellstofftuch wurde die Platte mit 25 μ l Capture-Antikörper-Lösung pro Well

benetzt. Die Capture-Antikörper-Lösung für den PD-1 ELISA wurde aus einem aus Ziegen Serum gewonnenem Anti-PD-1-Antikörper in PBS mit einer Konzentration von 2 µg/ml hergestellt. Für die Capture-Antikörper-Lösung des PD-L1 ELISA wurde der murine Anti-PD-L1-Antikörper sowie PBS verwendet, die Konzentration der Lösung belief sich auf 4 µg/ml. Nach Abdichtung der Platte mit Verschlussfolie (ELISA Plate Sealers) wurde diese für 5 Minuten mit 700 U/min bei Raumtemperatur geschüttelt und über Nacht bei 2-8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte zunächst gewaschen. Als Waschpuffer wurde PBS mit 0,05 % Tween®20 verwendet. Pro Well wurden 200 µl Waschpuffer aufgetragen. Jeder Waschvorgang dieses Versuches beinhaltet drei aufeinanderfolgende Durchgänge. Im nächsten Schritt wurde als Blockierungsreagenz 150 µl PBS mit 5 % bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V) pro Well hinzugegeben und es erfolgte eine Inkubation auf dem Schüttler bei 500 U/min und Raumtemperatur für 60 Minuten. Durch die Applikation der Blockierungsreagenz wurden freie Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte gesättigt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern und anderen Proteinen zu reduzieren.

Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Proteinstandards, Kontrollen und Proben mit 25 µl Volumen pro Well aufgetragen und für 120 Minuten bei Raumtemperatur und 500 U/min geschüttelt.

Die sieben verwendeten Standards wurden durch serielle 1:4 Verdünnung mit Konzentrationen von 30 ng/ml bis 0,0073242 ng/ml hergestellt. Bei der Herstellung der Standardreihe wurde bei dem PD-1-Assay mit Diluent 2 und bei dem PD-L1-Assay mithilfe von PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V) verdünnt. Als achter Standard erfolgte die Verwendung des bei dem jeweiligen Assay verwendeten Verdünnungsmittels als Puffer zur Ermittlung des Blankwerts.

Die Proben wurden unverdünnt aufgetragen.

Die erneut gewaschene Platte wurde mit 25 µl Detektions-Antikörper-Lösung pro Well für weitere 120 Minuten bei 500 U/min und Raumtemperatur inkubiert. Bei den Detektionsantikörpern handelt es sich um biotinylierte Ziegen-Antikörper. Für die Herstellung der Detektions-Antikörper-Lösung von PD-1 wurden diese mit PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V) verdünnt, bei PD-L1 erfolgte die Verdünnung mit Diluent 3. Die Konzentration der Detektions-Antikörper-Lösung betrug 400 ng/ml für PD-1 und 100 ng/ml für PD-L1.

Nach dem Waschen der Platte erfolgte die Zugabe von 25 µl SULFO-TAG Streptavidin-Lösung pro Well und eine Inkubation von weiteren 120 Minuten bei 500 U/min und Raumtemperatur. Für die Herstellung der SULFO-TAG Streptavidin-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml wurde MSD SULFO-TAG Labeled Streptavidin sowie PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V) verwendet.

Nach dem letzten Waschvorgang wurden auf die Platte pro Well 150 µl MSD Gold Read Buffer A gegeben und es erfolgte unmittelbar die Vermessung der Platte durch den Mesoscale Quickplex SQ 120. Die erhobenen Daten wurden mittels der Software Discovery Workbench 4.0.12 analysiert und verarbeitet.

Die Rationale des beschriebenen Messverfahrens begründet sich auf den Ergebnissen unserer laborinternen Methodvalidierung (Krueger, Mayer, Gerckens, et al. 2022; Krueger, Mayer, Kottmaier, et al. 2022), welche gemäß der Richtlinie zur bioanalytischen Methodvalidierung der Europäischen

Arzneimittel-Agentur sowie einer Publikation zur Methodvalidierung von Immunassays von U. Andreasson et al. erfolgte (Committee for Medical Products for Human Use (CHMP) 2011; Andreasson et al. 2015). Im Rahmen der Methodvalidierung wurden auch die Quantifikationsgrenzen festgelegt. Sie definieren den Bereich, in dem Messwerte mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit generiert werden. Zur Bestimmung dieser wurden für jeden der Standards mindestens 9 Standardkurven verglichen und in Bezug auf den Variationskoeffizienten als Maß der Präzision sowie die Wiederfindungsrate als Index der Richtigkeit überprüft. Die Konzentrationen des höchsten und niedrigsten verwendeten Standards (30 ng/ml und 0,0073 ng/ml) konnten als Quantifikationsgrenzen für PD-1 und PD-L1 festgelegt werden, da in vorrausgegangenen Experimenten zur Assay-Validierung die Kriterien eines Variationskoeffizienten von maximal 20 % und einer Wiederfindungsrate von 80-120 % erfüllt wurden.

3.4 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen sowie Erstellung der Graphiken erfolgten zum einen anhand von Python-Skripten in Jupyter Notebooks (Loizides et al. 2016) mit den Software-Paketen „python“ (version 3.6) (van Rossum and Drake 2009), numpy (version 1.15.4), pandas (version 0.23), scipy (version 1.5.2), lifelines (version 0.26.3) (Davidson-Pilon 2019) scikit-learn (version 0.23.1) (Pedregosa et al. 2011), seaborn (version 0.11.2), und zum anderen mittels R-Skripten (Team 2020) mit den Softwarepaketen „survminer“, „survival“ (Therneau 2021), „pROC“ (Robin et al. 2011) und riskRegression (Gerds 2021).

Basischarakteristika

In der deskriptiven Auswertung sind die Daten mittels absoluter und relativer Häufigkeit sowie Median und Wertebereich dargestellt. In Tabelle 6 und 7 wird die Patientenanzahl als absolute Zahl sowie als Anteil in Prozent angegeben. Die %-Angaben wurden auf eine Ganzzahl gerundet, sodass in der Summe die Grundgesamtheit geringfügig von 100 % abweichen kann.

Überlebenszeitanalysen

Als Überlebenszeit definiert wurde der Zeitraum zwischen der Serumprobengewinnung (bei Studieneinschluss) und dem Studienendpunkt Tod jedweder Ursache.

Bei Überlebenszeitanalysen mit rechtszensierten Daten ist ein ausreichender Beobachtungszeitraum essenziell. Die Darstellung der Follow-up Rate über die Zeit in der Gesamtkohorte erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurve und die Berechnung der medianen Follow-up Zeit mittels Reversed-Kaplan-Meier-Methode. Die mediane Follow-up Zeit ist zu verstehen als mediane Beobachtungszeit der Patienten, welche in den Überlebenszeitanalysen rechtszensiert wurden, da der Studienendpunkt (Tod) nicht beobachtet wurde.

Die Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit in den drei Studiengruppen erfolgte anhand von Kaplan-Meier-Kurven unter Angabe der *Number at risk* und die Berechnung der jeweiligen medianen Überlebenszeit anhand der Kaplan-Meier-Methode. Zur Testung auf einen möglichen Unterschied der Überlebensraten zwischen den drei Gruppen erfolgte ein *Pairwise log-rank test*.

Biomarker mit Quantifikationsgrenzen und Verteilung

Die Verteilung der gemessenen Serumkonzentrationen der Biomarker wurde in Bezug auf die Quantifikationsgrenzen untersucht und die Biomarker mit weniger als 5 % aller Messwerte innerhalb der Quantifikationsgrenzen wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die statistische Auswertung erfolgte unter Adjustierung der außerhalb der testspezifischen Quantifikationsgrenzen gelegenen Messwerte auf den jeweiligen Grenzwert.

Die Verteilung der Messwerte wurde auf eine Normalverteilung untersucht. Die Darstellung der Verteilung mittels Boxplots erfolgte unter Normalisierung auf den Median.

Aufgrund der häufigen log-Normalverteilung von Biomarker-Serumkonzentrationen wurden für die Korrelationsanalysen und Analysen von Gruppenunterschiede der Biomarker die logarithmierten Werte verwendet.

Korrelationen

Zur Korrelation der \log_{10} -transformierten Serumkonzentrationen der Biomarker und dem \log_{10} -transformierten Patientenalter wurde eine Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Für die Korrelation der Serumkonzentrationen der Biomarker untereinander erfolgte ebenfalls eine Rangkorrelation nach Spearman. Es erfolgte eine farbkodierte Darstellung der Korrelationskoeffizienten als *Heatmap* mit hierarchischem Clustering.

Biomarker-Serumkonzentrationen

Die numerische Darstellung der Biomarker-Serumkonzentrationen in der Gesamtkohorte und den Studiengruppen erfolgte mit Median und Wertebereich. Die Darstellung der Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen in den drei Studiengruppen erfolgte als Boxplot-Diagramm mit logarithmischer Abszissenbeschriftung.

Zur statistischen Testung der Unterschiede von (nicht normalverteilten) Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen den Studiengruppen im Sinne einer Trennbarkeit der Gruppen anhand der Biomarker wurden *Receiver operating characteristic* (ROC)-Kurven und *Area under the Curve* (AUC)-Analysen ausgewählt. Je weiter sich die ROC-Kurve von der Diagonalen unterscheidet und je grösser die Fläche unter der ROC-Kurve (höherer AUC-Wert), desto besser ist die Trennschärfe. Als signifikantes Ergebnis wurde ein 95 % Konfidenzintervall der AUC mit Ausschluss des Wertes 0,5 gewertet.

Prognostische Analysen

In univariaten Cox-Regressionsanalysen wurden klinische Parameter in binärer oder ordinalskaliertes Ausprägung und die Biomarker-Serumkonzentrationen in intervallskaliertes Ausprägung auf eine prognostische Relevanz untersucht mit der zensierten Überlebenszeit als Zielvariable. Die Hazard Ratio (HR) wurde folgendermaßen berechnet:

$$HR = \frac{h_0(t) \times e^{\beta \times (x+1)}}{h_0(t) \times e^{\beta \times x}} = e^{\beta(x+1) - \beta x} = e^{\beta}$$

Die Hazard Ratio bezieht sich bei binären Parametern auf das genannte Merkmal, bei den Biomarker-Serumkonzentrationen bezieht sich die Hazard Ratio auf die um eine Einheit (z.B. 1 ng/ml bei CEA oder 1 pg/ml bei IL-10) erhöhte Serumkonzentration.

Zur Bestimmung der Unabhängigkeit der prognostischen Relevanz der Serumkonzentrationen von klinischen Merkmalen wurde mit den Biomarkern und klinischen Parametern mit signifikant erhöhter Hazard Ratio in der univariaten Analyse eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahl von tumorresezierten Patienten und Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und daraus resultierender geringerer statistischer Power wurden bei diesen beiden Studiengruppen in der multivariaten Analyse nur jeweils zwei Variablen paarweise berücksichtigt.

Zur quantitativen Bestimmung eines optimalen Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentrationen zur Voraussage der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden *Receiver operating characteristic* (ROC) Kurven erstellt und der Youden-Index berechnet (Youden 1950). Der hier gesuchte Grenzwert des Biomarkers sollte bestmöglich unterscheiden zwischen Patienten, die länger leben, und Patienten, die kürzer (oder genauso lange) leben wie das mediane Überleben der eigenen Studiengruppe. Zur Bestimmung dieses Grenzwertes wurde eine ROC-Analyse erstellt und der Youden-Index zur Ermittlung des optimalen Grenzwertes herangezogen, welcher zwischen einem längeren bzw. kürzerem Überleben als das gruppenspezifische mediane Überleben diskriminiert. Mithilfe dieses ermittelten Grenzwertes wurde die jeweilige Kohorte unterteilt in zwei Gruppen und deren Überlebenswahrscheinlichkeiten mit Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und im *Log-rank test* verglichen. Diese statische Analyse nähert sich damit der Fragestellung einer systematischen Biomarker-Grenzwertbestimmung zur Identifikation von Patienten mit besserer bzw. schlechterer Prognose innerhalb der Kohorte.

Prognostische Modelle

Eine Kombination der Biomarker CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PD-1 und PD-L1 zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens in der fernmetastasierten Studiengruppe wurde in zwei prognostischen Modellen untersucht:

Ein Cox-Regressionsmodell mit der *Leave-One-Out*-Methode wurde erstellt. Dabei wurde jeweils ein Patient aus dem Datensatz entfernt, mit den restlichen Patienten die Cox-Regression berechnet (inklusive automatischer Auswahl der Biomarker) und anschließend wurde mithilfe der ermittelten Cox-Regressionsfunktion die individuelle (geschätzte) Überlebenskurve für den vorher entfernten Patienten ermittelt. Auf diese Weise wird für jeden Patienten eine individuelle Überlebenskurve bestimmt, wobei der Patient nicht an der Bestimmung der Parameter für die eigene Cox-Regressionsfunktion beteiligt war. Anhand einer ROC-Kurve wurde evaluiert, wie gut die Überlebenswahrscheinlichkeit bei 365 Tagen im Cox-Regressionsmodell das tatsächliche 1-Jahres-Überleben der Patienten vorhersagt. Die Koeffizienten des Cox-Regressionsmodells sind unter Annahme der Berücksichtigung aller Patienten aufgeführt. Aufgrund der *Leave-On-Out*-Kreuzvalidierung wird bei der Erstellung der Überlebenskurve jedes Patienten dieser Patient jeweils unberücksichtigt gelassen und eine Neuberechnung der Koeffizienten durchgeführt, sodass die Koeffizienten für die Überlebenskurven der einzelnen Patienten geringfügig variieren.

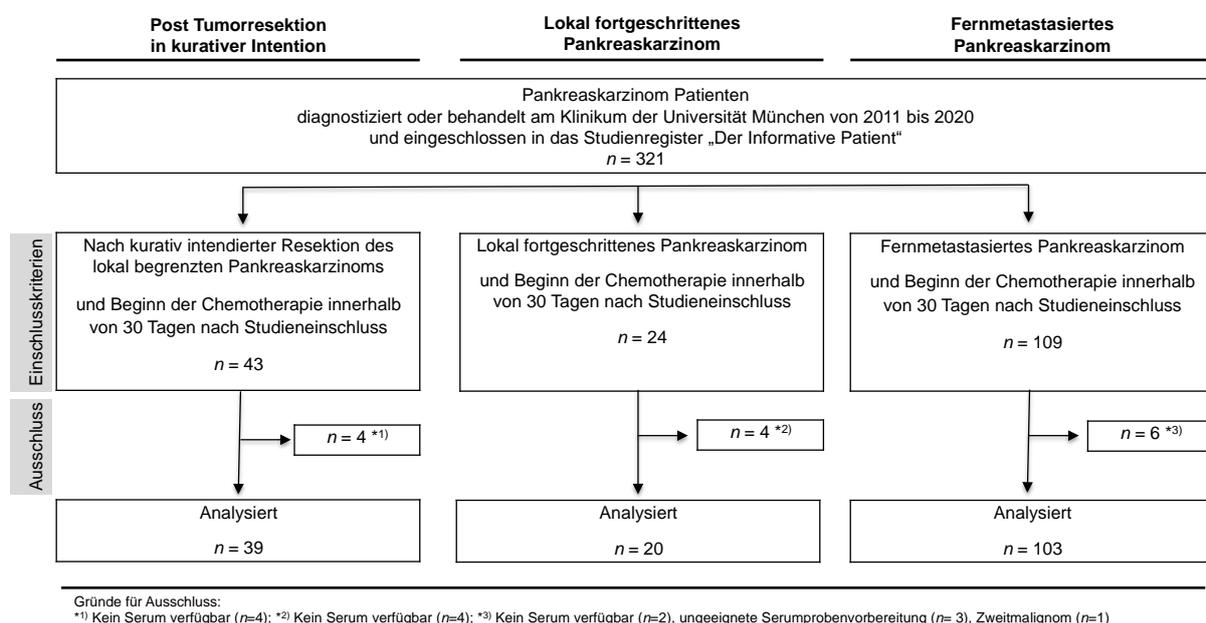
Als komplexeres *Machine learning* Modell wurde ein *Random Forest* Modell aus denselben Daten erstellt und mittels der *k-fold* Validierungsmethode (mit $k=5$) validiert. Dabei wird das Modell mit 80 % der Daten trainiert und an 20 % validiert. Aus diesen 20 % resultiert jeweils eine ROC-Kurve.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Charakteristika

Von 321 Pankreaskarzinom Patienten im Studienregister „Der Informative Patient“ hatten 176 Patienten eine Studienblutabnahme innerhalb von 30 Tagen vor Beginn der Chemotherapie. Von diesen 176 Patienten wurden 14 Patienten ausgeschlossen aufgrund von fehlender Verfügbarkeit von Serum, ungeeigneter Probenvorbereitung oder Zweitmalignom. Folglich konnten 39 resezierte Pankreaskarzinompatienten, 20 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und 103 Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom analysiert werden (Abbildung 1).

Abbildung 1: Studiendesign



Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der Serumprobenentnahme betrug in der tumorresezierten Gruppe 66 Jahre (range 41-77), in der Kohorte mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom 66,5 Jahre (range 46-83) und bei den Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom 63 Jahre (range 29-86).

Die Geschlechterverteilung belief sich auf 62 % männliche Patienten und 38 % weibliche Patienten beim fernmetastasierten Pankreaskarzinom und resezierten Pankreaskarzinom, beim lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom ließ sich eine umgekehrte Verteilung feststellen mit 35 % männlichen und 65 % weiblichen Patienten. Die Verteilung des *ECOG Performance Status* zum Zeitpunkt der Serumprobenentnahme ist in Tabelle 6 aufgeschlüsselt. Die meisten Patienten wiesen einen ECOG von 0 bis 1 auf.

Bei Patienten mit reseziertem oder lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom war dieses zu 82 % bzw. 80 % im Pankreaskopf lokalisiert, während bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom der Primarius in 52 % im Pankreaskörper und/oder Pankreasschwanz lokalisiert war.

Bei der überwiegenden Mehrheit von 153 Patienten ergab die histologische Untersuchung ein duktales Adenokarzinom, ein Azinuszellkarzinom wiesen drei Patienten auf.

Von 103 Patienten mit metastasiertem Tumorleiden zeigten 90 Patienten eine synchrone Metastasierung und 13 Patienten eine metachrone Metastasierung.

Von den resezierten Patienten wiesen 31 % ein UICC-Stadium IIA auf, 67 % ein UICC-Stadium IIB und 3 % ein UICC-Stadium III. Bei einem Großteil der Patienten (72 %) konnten tumorfreie Resektionsränder erreicht werden. Bei 26 % ist der Resektionsstatus histologisch als „R1“ klassifiziert worden und bei einem Patienten (3 %) konnte trotz kurativ intendierter Operation lediglich ein „R2“ Resektionsstatus erzielt werden. Der Differenzierungsgrad des Tumorresektats wurde in 67 % der Fälle als Grad 3, in 28 % der Fälle als Grad 2 und in 3 % als Grad 1 beurteilt.

Bis zum Ende des Beobachtungszeitpunktes am 31.01.2020 waren 64 % der Patienten mit erfolgter Tumorresektion, 85 % der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und 96 % der Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom verstorben (Tabelle 6).

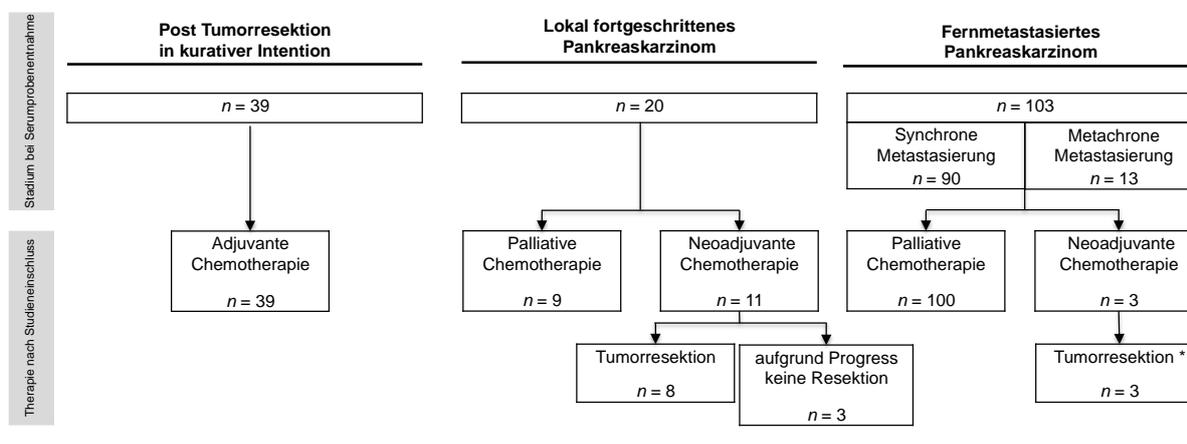
Tabelle 6: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Serumprobenentnahme (n=162)

Erkrankungsstadium (bei Probenentnahme)	Post Tumorresektion in kurativer Intention	Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	Metastasiertes Pankreaskarzinom
Fallzahl			
Anzahl der Patienten	39	20	103
Alter (in Jahren)			
Median	66,0	66,5	63,0
Range	41-77	46-83	29-86
Geschlecht			
Männlich	24 (62 %)	7 (35 %)	64 (62 %)
Weiblich	15 (38 %)	13 (65 %)	39 (38 %)
Performance Status			
ECOG 0	13 (33 %)	12 (60 %)	29 (28 %)
ECOG 1	12 (31 %)	5 (25 %)	34 (33 %)
ECOG 2	0 (0 %)	0 (0 %)	7 (7 %)
ECOG 3	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (1 %)
Angabe fehlt	14 (36 %)	3 (15 %)	32 (31 %)
Tumorlokalisation			
Caput	32 (82 %)	16 (80 %)	46 (45 %)
Corpus, Cauda	7 (18 %)	4 (20 %)	54 (52 %)
Angabe fehlt	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (3 %)
Tumorhistologie			
Duktaler Ursprung	37 (95 %)	19 (95 %)	97 (94 %)
Azinuszellkarzinom	1 (3 %)	0 (0 %)	2 (2 %)
Angabe fehlt	1 (3 %)	1 (5 %)	4 (4 %)
Metastasierungsart			
Synchron			90 (87 %)
Metachron			13 (13 %)
UICC TNM Klassifikation			
UICC IIA	12 (31 %)		
UICC IIB	26 (67 %)		

UICC III	1 (3 %)		
Resektionsstatus			
R0	28 (72 %)		
R1	10 (26 %)		
R2	1 (3 %)		
Grading			
Grad 1	1 (3 %)		
Grad 2	11 (28 %)		
Grad 3	26 (67 %)		
Angabe fehlt	1 (3 %)		
Verstorben			
Anzahl der Patienten	25 (64 %)	17 (85 %)	99 (96 %)

Eine Übersicht über die nach Studieneinschluss erfolgten Therapien ist in Abbildung 2 dargestellt. Nach erfolgter Tumorresektion in kurativer Intention erhielten alle Patienten eine adjuvante Chemotherapie entsprechend der Einschlusskriterien der Analyse. Die Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom erhielten eine palliative ($n=9$) oder neoadjuvante ($n=11$) Chemotherapie. Nach neoadjuvant intendierter Chemotherapie erfolgte die Tumorresektion in 8 Fällen, in 3 Fällen wurde die geplante Resektion aufgrund eines vorher festgestellten Tumorprogresses nicht durchgeführt. 100 Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom erhielten eine palliative Chemotherapie, lediglich 3 Patienten erhielten eine neoadjuvant intendierte Chemotherapie mit anschließender palliativer Resektion des Primärtumors im Rahmen eines individuellen Therapiekonzeptes (Abbildung 2).

Abbildung 2: Therapien nach Studieneinschluss



Die nach Studieneinschluss eingesetzten chemotherapeutischen Substanze sind in Tabelle 7 dargelegt. Nach erfolgter Tumorresektion erhielten 36 der resezierten Patienten (92 %) eine Gemcitabin-Monotherapie, ein Patient erhielt eine Gemcitabin-basierte Kombinationstherapie und ein Patient eine 5-FU-basierte Kombinationstherapie. Ein Patient, welcher in kurativer Intention operiert, letztendlich aber R2-reseziert war, erhielt eine Radiochemotherapie im Sinne einer Einzelfallentscheidung. Bei den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom wurde zu 75 % eine 5-FU-basierte Kombinationstherapie verabreicht. Die Chemotherapie der Patienten mit metastasiertem

Pankreaskarzinom bestand zu 44 % aus einer 5-FU-basierten Kombinationstherapie, zu 32 % aus einer Gemcitabin-Kombinationstherapie und 24 % erhielten eine Gemcitabin-Monotherapie.

Tabelle 7: Chemotherapien nach Studieneinschluss

Erkrankungsstadium (bei Serumprobenentnahme)	Post Tumorresektion in kurativer Intention	Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	Metastasiertes Pankreaskarzinom
Fallzahl			
Anzahl der Patienten	39	20	103
Chemotherapien (nach Studieneinschluss)			
Radiochemotherapie	1 (3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Gemcitabin-Monotherapie	36 (92 %)	3 (15 %)	25 (24 %)
Gemcitabin-basierte Kombinationstherapie	1 (3 %)	2 (10 %)	33 (32 %)
5-FU-basierte Kombinationstherapie	1 (3 %)	15 (75 %)	45 (44 %)

Der Studieneinschluss und die Entnahme der Serumprobe fanden in der Studiengruppe mit reseziertem Pankreaskarzinom im Median 54 Tage nach Tumorresektion statt und am selben Tag wie die erste adjuvante Chemotherapie. Die Zeit von Tumorresektion bis Beginn der adjuvanten Chemotherapie betrug im Median 57 Tage (Tabelle 8).

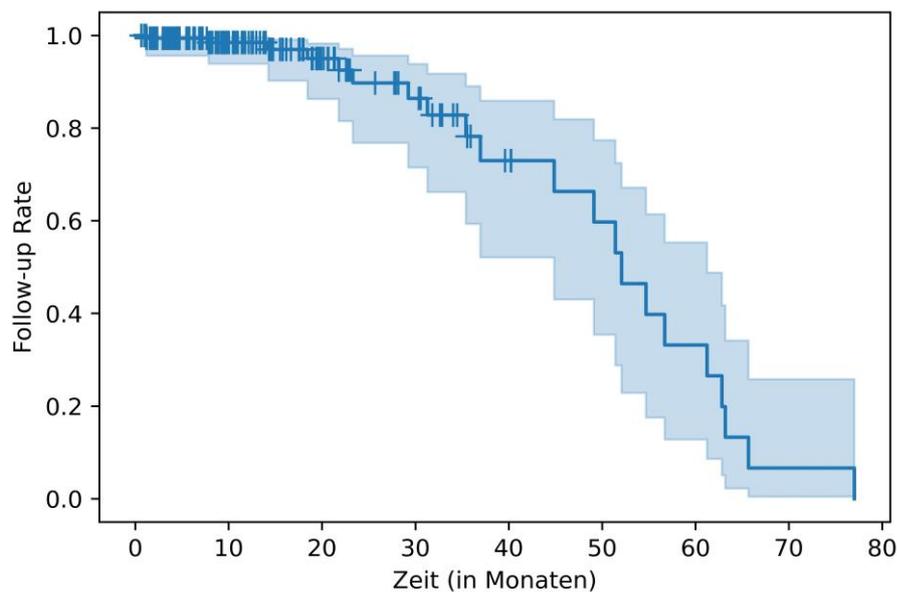
Tabelle 8: Zeitintervalle zwischen Tumorresektion, Serumprobenentnahme und Beginn der adjuvanten Chemotherapie

Zeitintervall	Median (Min.-Max.)
Zeit von Tumorresektion bis Serumprobenentnahme (in Tagen)	54 (29 - 120)
Zeit von Serumprobe bis Beginn adjuvante Chemotherapie (in Tagen)	0 (0 - 29)
Zeit von Tumorresektion bis Beginn adjuvante Chemotherapie (in Tagen)	57 (29 - 126)

4.2 Überlebenszeitanalysen

Die Reversed Kaplan-Meier-Kurve stellt die *Follow-up* Rate in der Gesamtkohorte im zeitlichen Verlauf dar (Abbildung 3). Die mediane *Follow-up* Zeit in der Gesamtkohorte betrug 52,07 Monate mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 44,8- 61,2 Monaten.

Abbildung 3: Reversed Kaplan-Meier-Kurve mit *Follow-up Rate* in der Gesamtkohorte

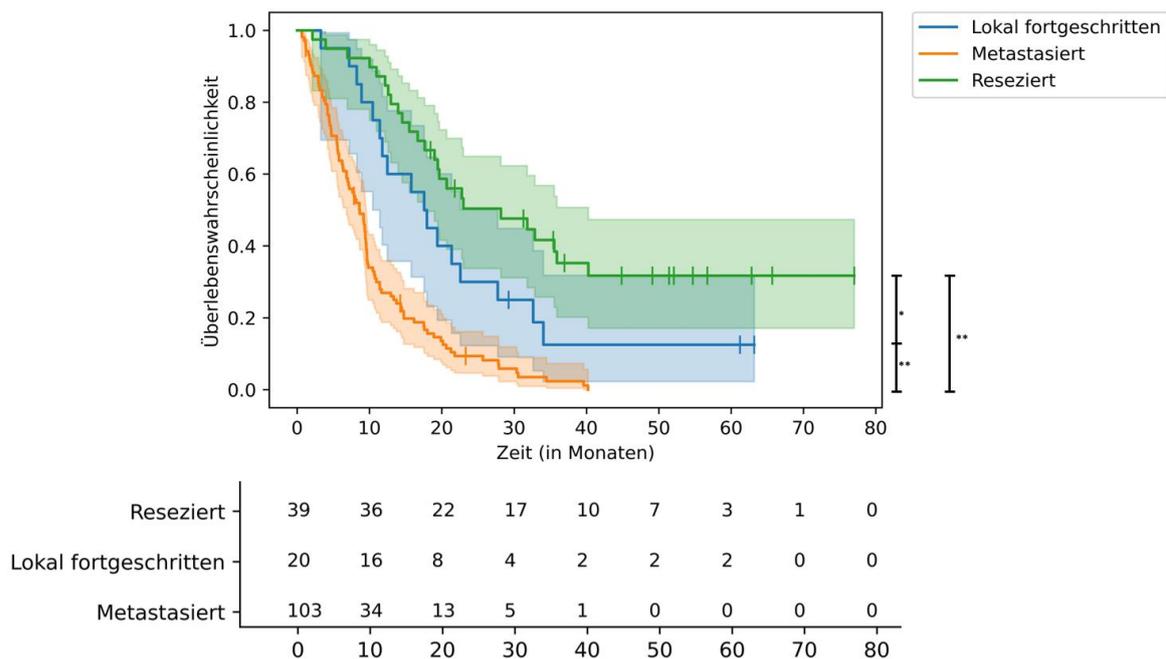


Die Reversed Kaplan-Meier-Kurve zeigt die *Follow-up Rate* mit 95 % Konfidenzband im Zeitverlauf.

Die mediane Überlebenszeit der Patienten nach kurativ intendierter Tumorresektion betrug 28,16 Monate (95 % CI 17,6- 40,2). Die Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom überlebten im Median 17,94 Monate (95 % CI 10,4- 27,7). Die Studiengruppe der Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom zeigte das kürzeste mediane Überleben mit 8,61 Monaten (95 % CI 6,8- 9,5).

Im paarweisen Vergleich der Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom, der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sowie der Patienten nach Tumorresektion konnte mittels Kaplan-Meier-Kurven und *Pairwise log-rank test* jeweils ein signifikanter Unterschied der Überlebensraten festgestellt werden (Abbildung 4).

Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebenswahrscheinlichkeit in den Studiengruppen



Die Kaplan-Meier-Kurven mit 95 % Konfidenzband zeigen die Überlebenswahrscheinlichkeiten für die drei Studiengruppen im Zeitverlauf. Für die mittels *Pairwise log-rank test* ermittelten Unterschiede zwischen den Überlebensraten sind die *p*-Werte ($p=0,04^*$, $p<0,005^{**}$) angegeben. Unterhalb des Diagramms ist für jede Studiengruppe die *Number at risk* im Zeitverlauf ersichtlich.

4.3 Biomarker mit Quantifikationsgrenzen und Verteilung

Die Analyse zur Verteilung der Serumkonzentrationen in Bezug auf die Quantifikationsgrenzen zeigte, dass die gemessenen Konzentrationen der Biomarker IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p70 und IL-13 in weniger als 5 % der analysierten Serumproben innerhalb der jeweiligen Quantifikationsgrenzen (Tabelle 9) lagen, sodass diese Biomarker in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt wurden. Die weitere Auswertung erfolgte für CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-8, TNF- α , PD-1 und PD-L1 (Abbildung 5).

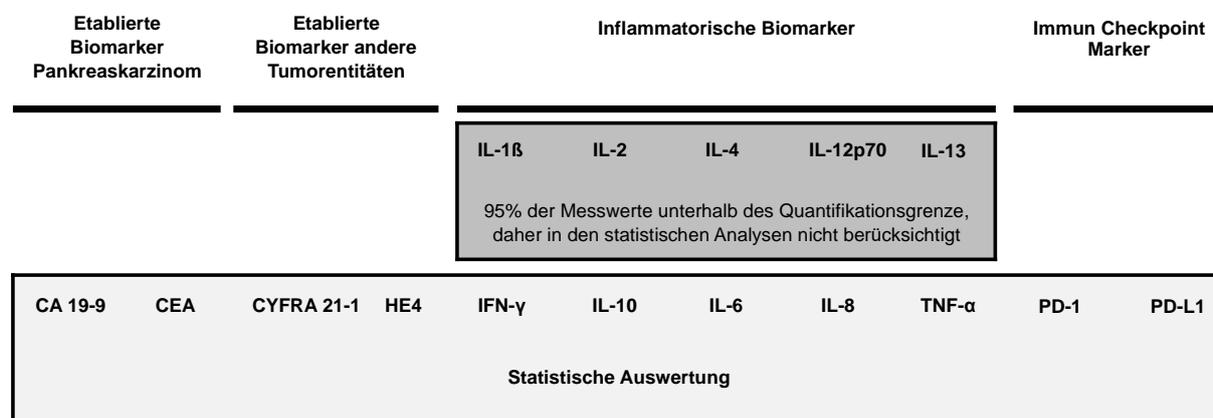
Tabelle 9: Quantifikationsgrenzen der Biomarker

Biomarker	LLOQ	ULOQ	Werte unterhalb LLOQ	Werte oberhalb ULOQ	Werte innerhalb LOQ
IL-1 β	0,646 pg/ml	375 pg/ml	157 (97 %)	0 (0 %)	5 (3 %)
IL-2	0,89 pg/ml	938 pg/ml	155 (96 %)	0 (0 %)	7 (4 %)
IL-4	0,218 pg/ml	158 pg/ml	159 (98 %)	0 (0 %)	3 (2 %)
IL-6	0,633 pg/ml	488 pg/ml	20 (12 %)	1 (1 %)	141 (87 %)
IL-8	0,591 pg/ml	375 pg/ml	0 (0 %)	9 (6 %)	153 (94 %)
IL-10	0,298 pg/ml	233 pg/ml	52 (32 %)	0 (0 %)	110 (68 %)

IL-12p70	1,22 pg/ml	315 pg/ml	158 (98 %)	0 (0 %)	4 (2 %)
IL-13	4,21 pg/ml	353 pg/ml	159 (98 %)	0 (0 %)	3 (2 %)
IFN-γ	1,76 pg/ml	938 pg/ml	29 (18 %)	0 (0 %)	133 (82 %)
TNF-α	0,69 pg/ml	248 pg/ml	3 (2 %)	0 (0 %)	159 (98 %)
CA 19-9	0,6 U/ml	100000 U/ml	8 (5 %)	6 (4 %)	148 (91 %)
CEA	0,2 ng/ml	1000 ng/ml	0 (0 %)	1 (1 %)	161 (99 %)
CYFRA 21-1	0,1 ng/ml	500 ng/ml	0 (0 %)	1 (1 %)	161 (99 %)
HE4	15 pmol/l	1500 pmol/l	0 (0 %)	0 (0 %)	162 (100 %)
PD-1	0,0073 ng/ml	30 ng/ml	0 (0 %)	1 (1 %)	161 (99 %)
PD-L1	0,0073 ng/ml	30 ng/ml	47 (29 %)	0 (0 %)	115 (71 %)

LLOQ = Lower level of quantification, ULOQ = Upper level of quantification, LOQ = Level of Quantification

Abbildung 5: Übersicht der Biomarker



Die Verteilung der gemessenen Serumkonzentrationen war rechtsschief (Abbildung 6), sodass die Werte zur Basis 10 logarithmiert wurden, wodurch diese eine zunehmende Annäherung an eine Normalverteilung zeigten mit jedoch immer noch deutlichen Abweichungen von dieser bei den meisten Biomarkern (Abbildung 7). Basierend darauf erfolgte keine Annahme einer Normalverteilung.

Abbildung 6: Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen mit Darstellung normalisiert auf den Median

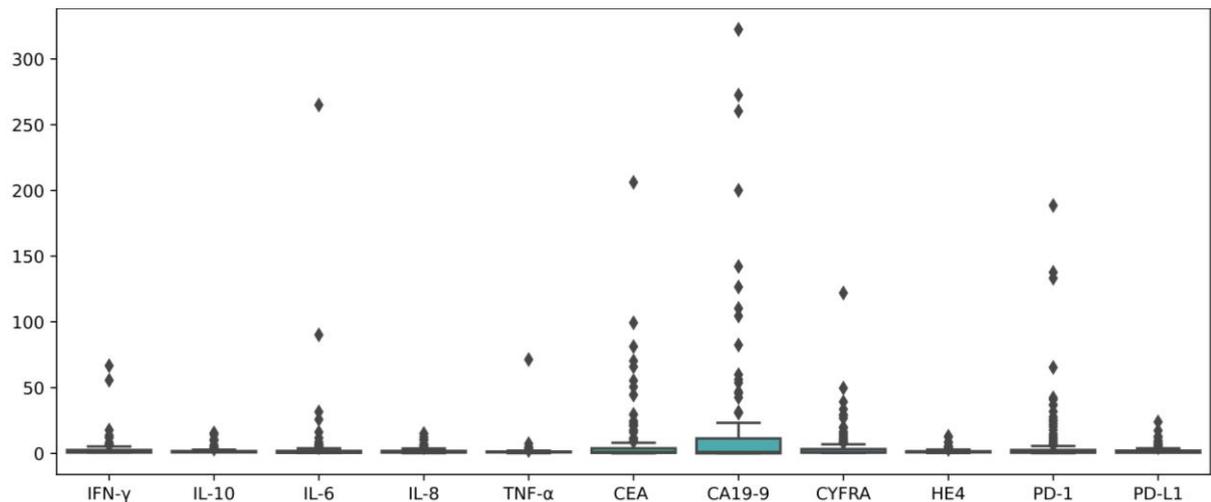
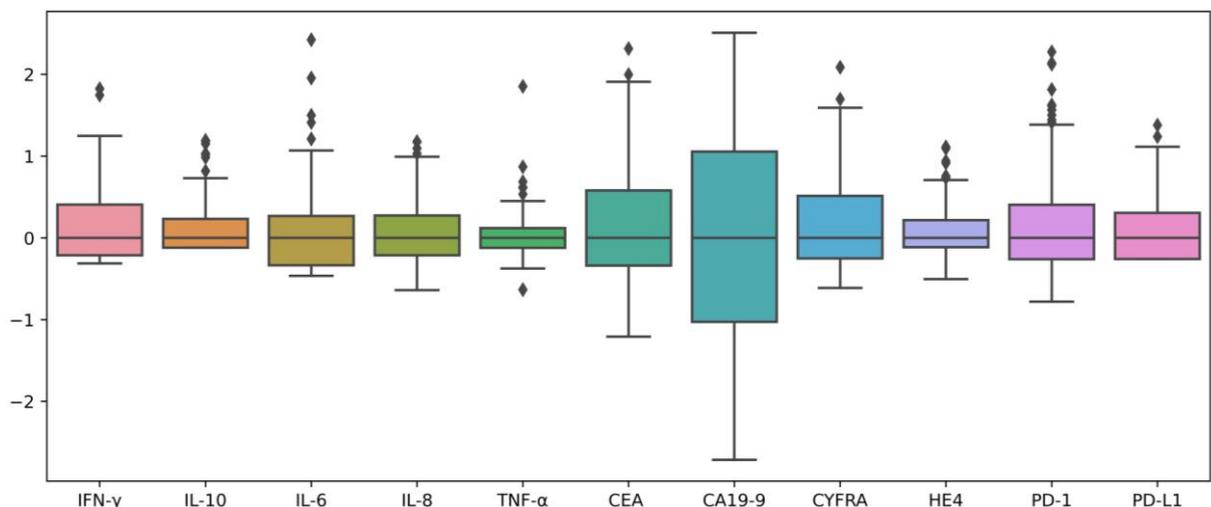


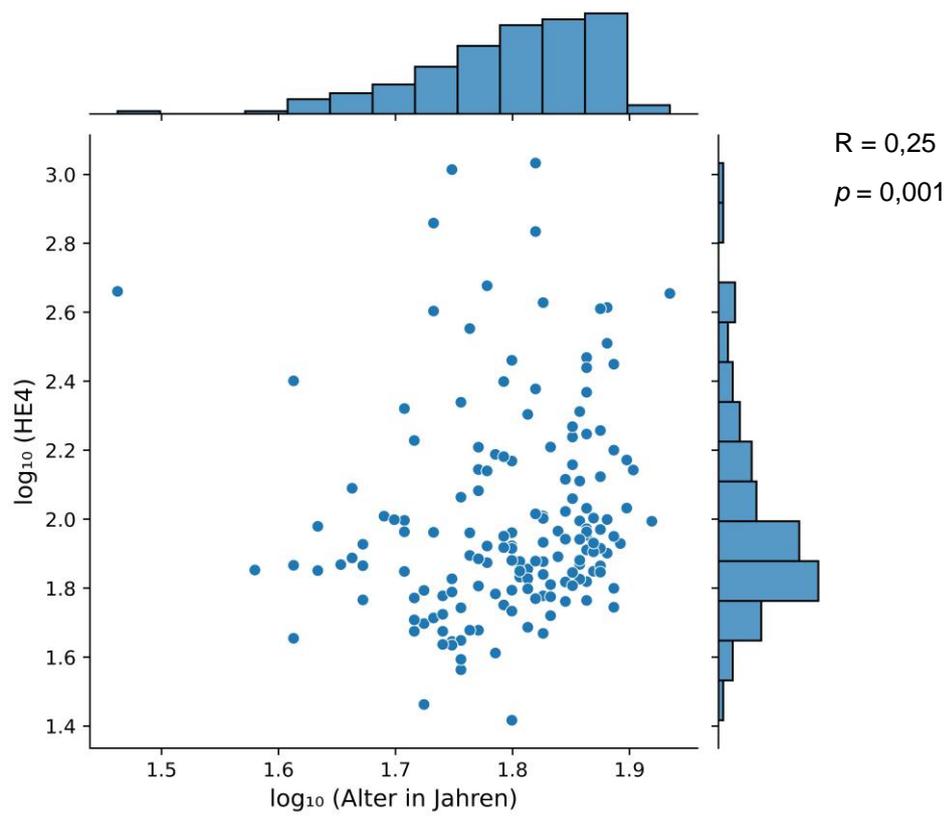
Abbildung 7: Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen mit Angabe der Messwerte logarithmiert zur Basis 10 und Darstellung normalisiert auf den Median



4.4 Korrelationen

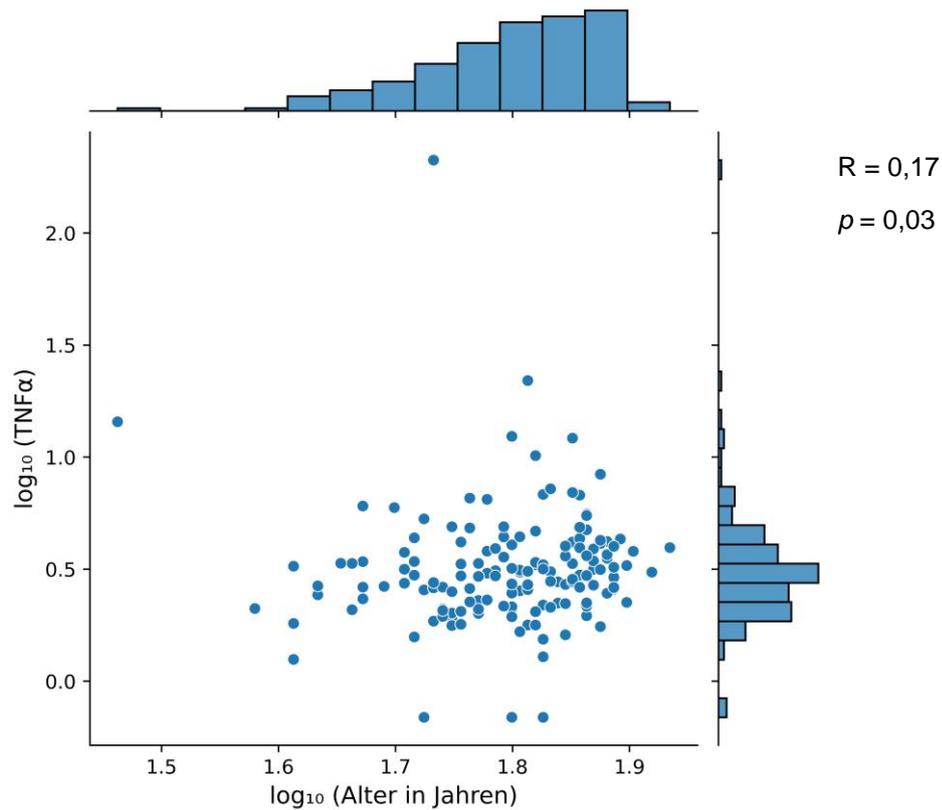
Bei Untersuchung der gesamten Studienkohorte konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Patientenalter und den Serumkonzentrationen der Biomarker HE4 und TNF- α festgestellt werden. Die Rangkorrelation nach Spearman ergab für HE4 und Alter einen Koeffizienten von 0,25 ($p=0,001$) und für TNF- α und Alter einen Koeffizienten von 0,17 ($p=0,03$). Damit zeigten sich schwache, aber signifikante Korrelationen (Abbildungen 8 und 9).

Abbildung 8: Korrelation von HE4-Serumkonzentration und Patientenalter



Die beiden Variablen Alter und HE4-Serumkonzentration sind logarithmiert zur Basis 10. Für die Rangkorrelation nach Spearman angegeben sind der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman R und der p -Wert.

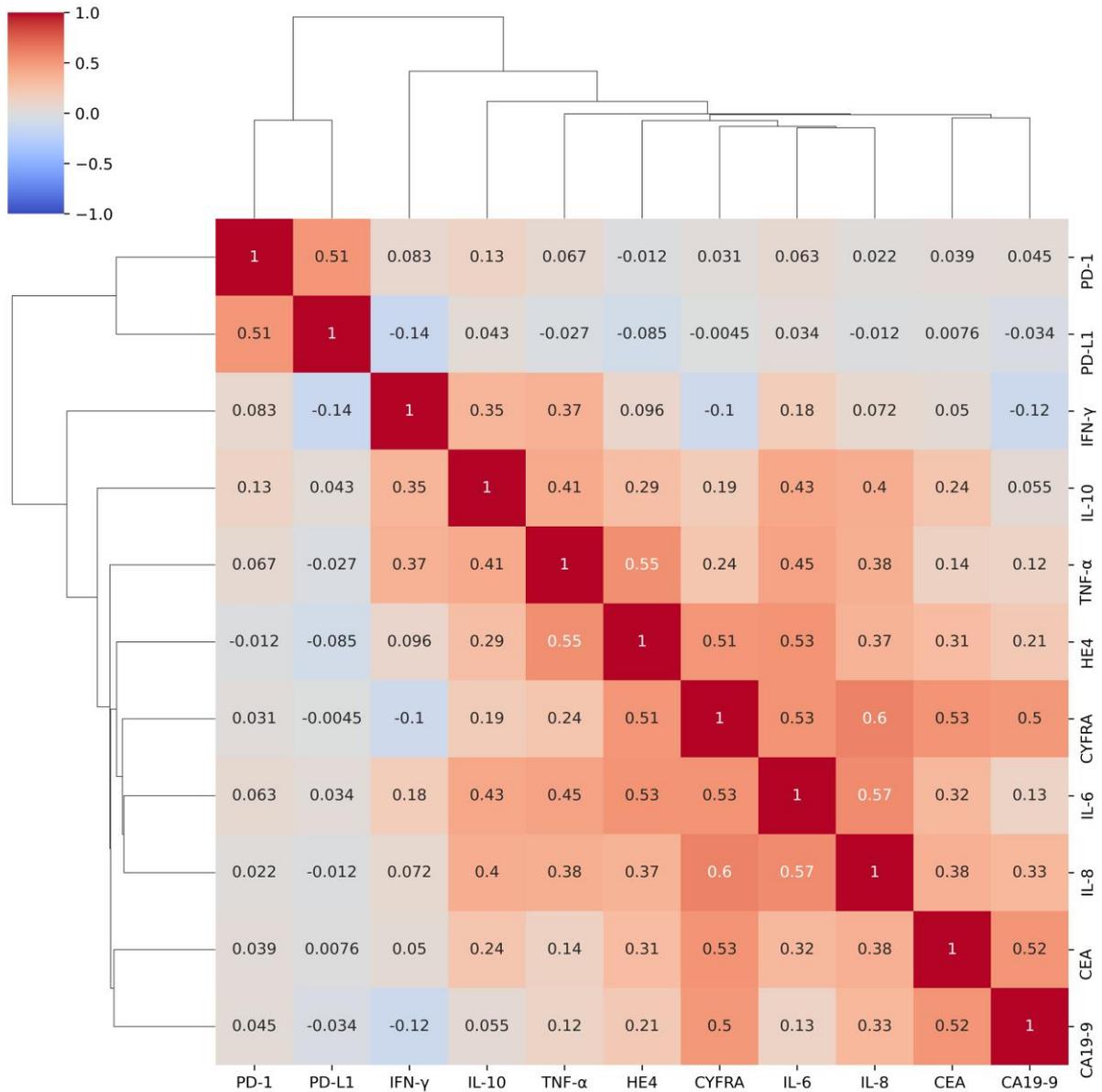
Abbildung 9: Korrelation von TNF- α -Serumkonzentration und Patientenalter



Die beiden Variablen Alter und TNF- α -Serumkonzentration sind logarithmiert zur Basis 10. Für die Rangkorrelation nach Spearman angegeben sind der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman R und der p -Wert.

Untersucht man die Korrelationen der Serumkonzentrationen zwischen den Biomarkern ergibt sich ein Spearman-Rangkorrelationskoeffizient $\geq 0,5$ in zehn Kombinationen: CA 19-9 und CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1, CEA und CYFRA 21-1, CYFRA 21-1 und HE4, HE4 und TNF- α , HE4 und IL-6, IL-6 und CYFRA 21-1, IL-6 und IL-8, IL-8 und CYFRA 21-1, PD-1 und PD-L1. Der p -Wert dieser zehn Korrelationen liegt jeweils bei $<0,001$ (Abbildung 10).

Abbildung 10: Darstellung des Korrelationskoeffizienten (R) nach Spearman zwischen Biomarker-Serumkonzentrationen mit hierarchischem Clustering als farbcodiertes *Heatmap* Diagramm



4.5 Serumkonzentrationen der Biomarker

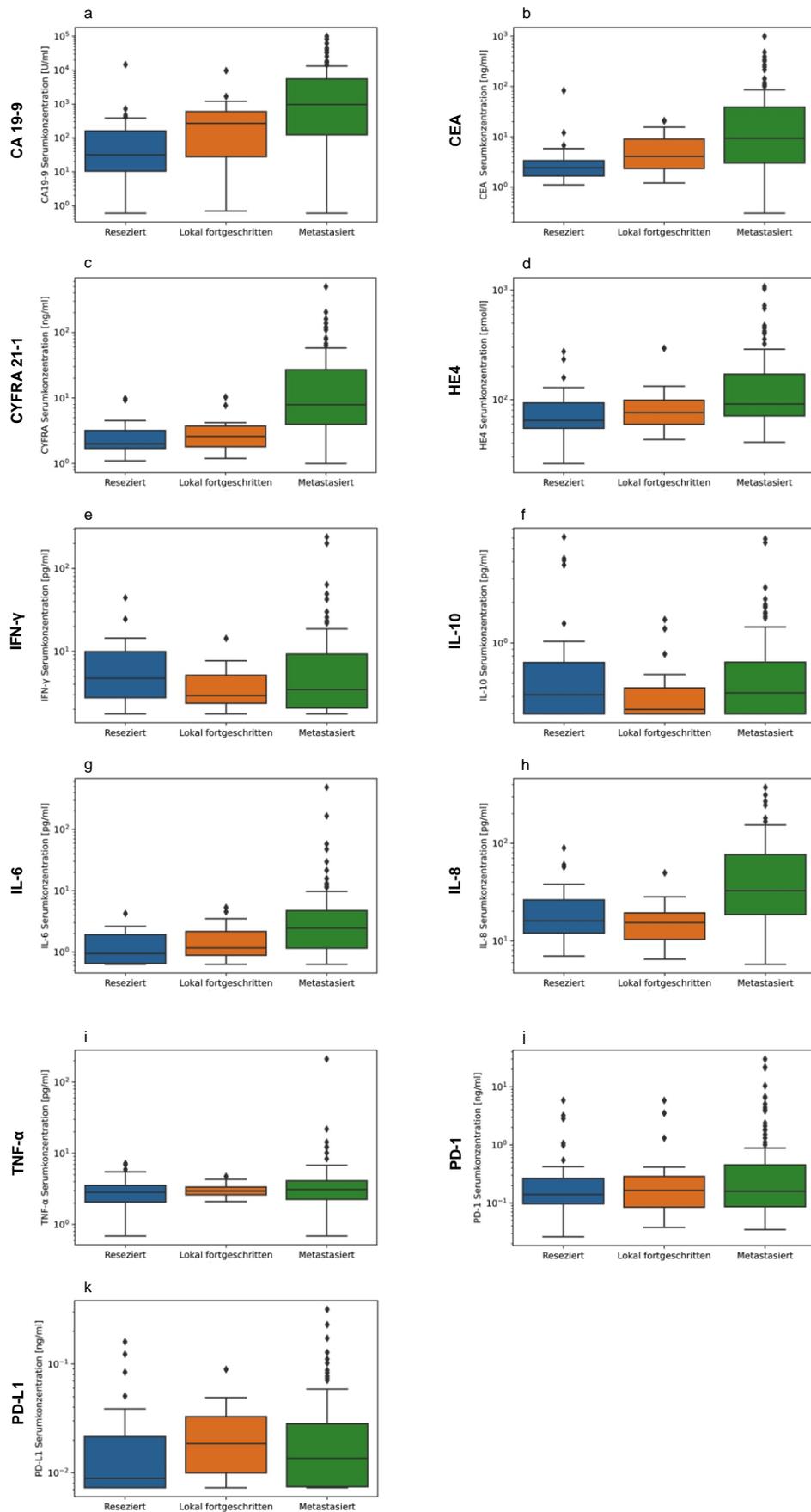
Die Biomarker-Serumkonzentrationen in der Gesamtpopulation und in den einzelnen Kohorten sind mit Median und Wertebereich in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Median mit Range (Min.-Max.) der Biomarker-Serumkonzentrationen

Biomarker	Gesamt	Reseziert	Lokal fortgeschritten	Metastasiert
CA 19-9 (U/ml)	310 (0,60-100000)	31,9 (0,60-14503)	269 (0,70-9626)	971 (0,60-100000)
CEA (ng/ml)	4,85 (0,30-1000)	2,40 (1,10-82,7)	4,05 (1,20-20,9)	9,30 (0,30-1000)
CYFRA 21-1 (ng/ml)	4,10 (1,00-500)	2,00 (1,10-9,80)	2,60 (1,20-10,3)	7,90 (1,00-500)
HE4 (pmol/l)	83,1 (26,1-1079)	64,6 (26,1-275)	76,1 (43,3-294)	91,3 (40,9-1079)
IFN- γ (pg/ml)	3,61 (1,76-241)	4,73 (1,76-44,4)	2,93 (1,76-14,4)	3,47 (1,76-241)
IL-10 (pg/ml)	0,39 (0,30-6,12)	0,41 (0,30-6,12)	0,32 (0,30-1,49)	0,43 (0,30-5,93)
IL-6 (pg/ml)	1,84 (0,63-488)	0,95 (0,63-4,25)	1,16 (0,63-5,34)	2,46 (0,63-488)
IL-8 (pg/ml)	25,0 (5,75-375)	16,0 (6,97-89,5)	15,3 (6,46-49,6)	32,7 (5,75-375)
TNF- α (pg/ml)	2,97 (0,69-212)	2,85 (0,69-7,21)	2,96 (2,10-4,74)	3,11 (0,69-212)
PD-1 (ng/ml)	0,16 (0,03-30,0)	0,14 (0,03-5,87)	0,17 (0,04-5,83)	0,16 (0,03-30,0)
PD-L1 (ng/ml)	0,01 (0,0073-0,32)	0,01 (0,0073-0,16)	0,02 (0,0073-0,09)	0,01 (0,0073-0,32)

Die Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen in den drei Kohorten ist in Abbildung 11 dargestellt. Numerisch zeigte sich bei CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6 und TNF- α der höchste Median in der metastasierten Gruppe und ein höherer Median in der lokal fortgeschrittenen Gruppe als in der tumorresezierten Gruppe (Tabelle 10 und Abbildung 11).

Abbildung 11: Verteilung der Biomarker-Serumkonzentrationen in den drei Kohorten, dargestellt als Boxplot-Diagramm mit logarithmischer Darstellung der y-Achse



Da numerische Unterschiede zwischen Mittelwerten keine Aussage darüber zulassen, wie ein Biomarker zwischen den Gruppen unterscheiden kann, wurde zur weiteren statistischen Analyse eine AUROC-Analyse durchgeführt. In der AUROC-Analyse ergab sich ein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen von CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6 und IL-8 zwischen den Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sowie zwischen den Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und den Patienten nach Tumorresektion. Die beste Diskriminationsfähigkeit zwischen den Patienten mit metastasiertem und lokal fortgeschrittenem Tumor zeigten CYFRA 21-1 und IL-8 (AUC 0,85, 95 % CI 0,76-0,93 und AUC 0,81, 95 % CI 0,72-0,9). Zwischen den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Tumor und den Patienten nach Resektion des lokal begrenzten Tumors zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied in den Serumkonzentrationen von CEA. Für IFN- γ , IL-10, TNF- α , PD-1 und PD-L1 konnte kein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen zwischen den Studiengruppen festgestellt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Area under the curve (AUC)-Werte mit 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) der Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven zur Darstellung möglicher Unterschiede der Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen den Studiengruppen

	<i>Metastasiert vs. Lokal fortgeschritten</i>		<i>Metastasiert vs. Reseziert</i>		<i>Lokal fortgeschritten vs. Reseziert</i>	
	AUC	95 % CI	AUC	95 % CI	AUC	95 % CI
CA 19-9 (U/ml)	0,68	(0,57-0,78)*	0,78	(0,7-0,86)*	0,66	(0,49-0,83)
CEA (ng/ml)	0,66	(0,56-0,77)*	0,78	(0,71-0,86)*	0,71	(0,56-0,85)*
CYFRA 21-1 (ng/ml)	0,85	(0,76-0,93)*	0,89	(0,83-0,95)*	0,59	(0,43-0,75)
HE4 (pmol/l)	0,65	(0,52-0,77)*	0,71	(0,61-0,8)*	0,58	(0,43-0,73)
IFN- γ (pg/ml)	0,56	(0,45-0,68)	0,56	(0,46-0,66)	0,64	(0,5-0,79)
IL-10 (pg/ml)	0,59	(0,47-0,72)	0,52	(0,41-0,63)	0,56	(0,41-0,71)
IL-6 (pg/ml)	0,67	(0,55-0,79)*	0,75	(0,67-0,83)*	0,6	(0,44-0,75)
IL-8 (pg/ml)	0,81	(0,72-0,9)*	0,76	(0,67-0,84)*	0,56	(0,41-0,72)
TNF- α (pg/ml)	0,51	(0,4-0,62)	0,57	(0,46-0,68)	0,56	(0,41-0,71)
PD-1 (ng/ml)	0,47	(0,33-0,61)	0,52	(0,42-0,62)	0,5	(0,34-0,67)
PD-L1 (ng/ml)	0,55	(0,41-0,68)	0,61	(0,5-0,72)	0,64	(0,49-0,79)

Im Folgenden sind die korrespondierenden ROC-Kurven dargestellt (Abbildung 12 und 13).

Abbildung 12: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven und Area under the curve (AUC)-Analyse zur Darstellung möglicher Unterschiede der Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

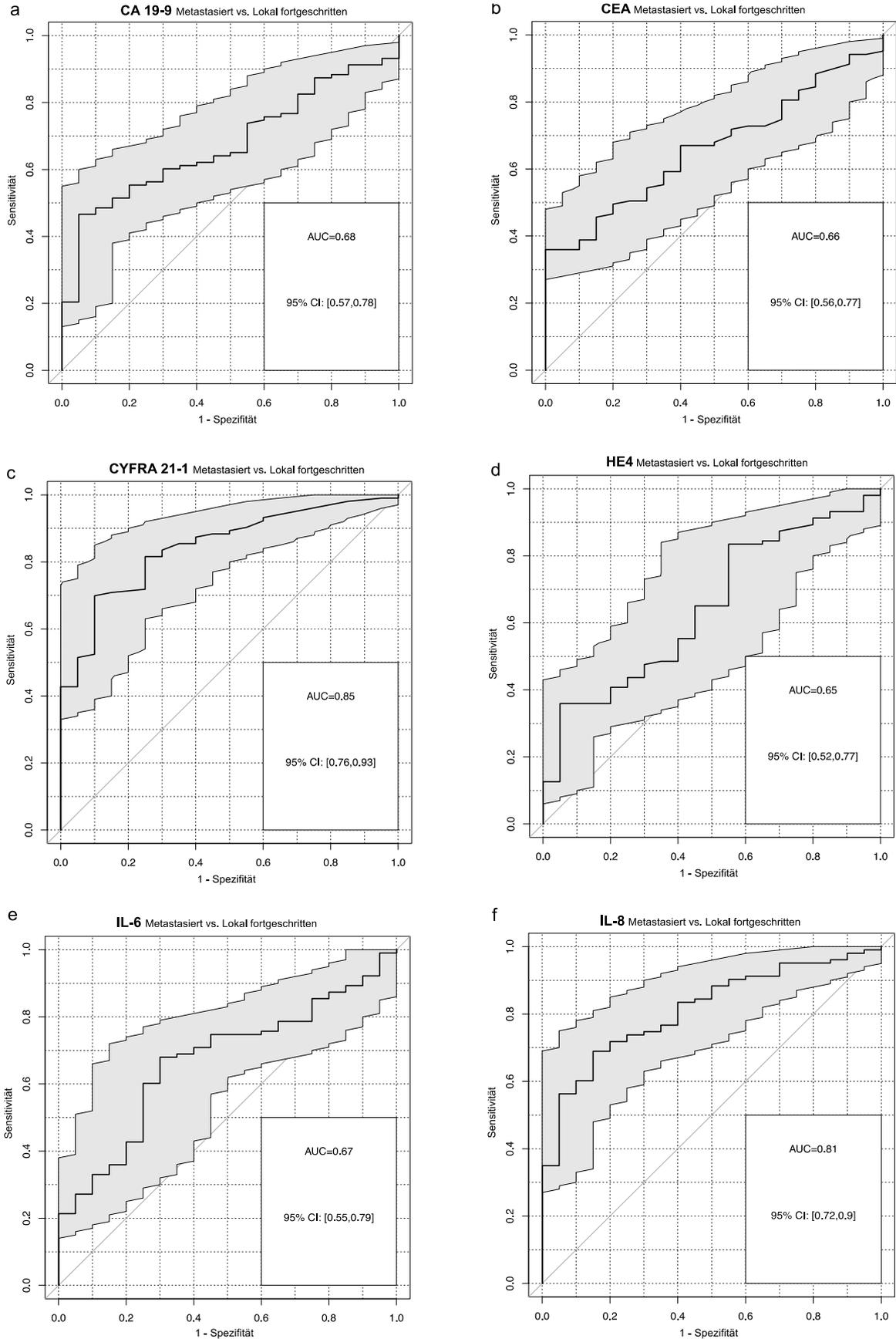
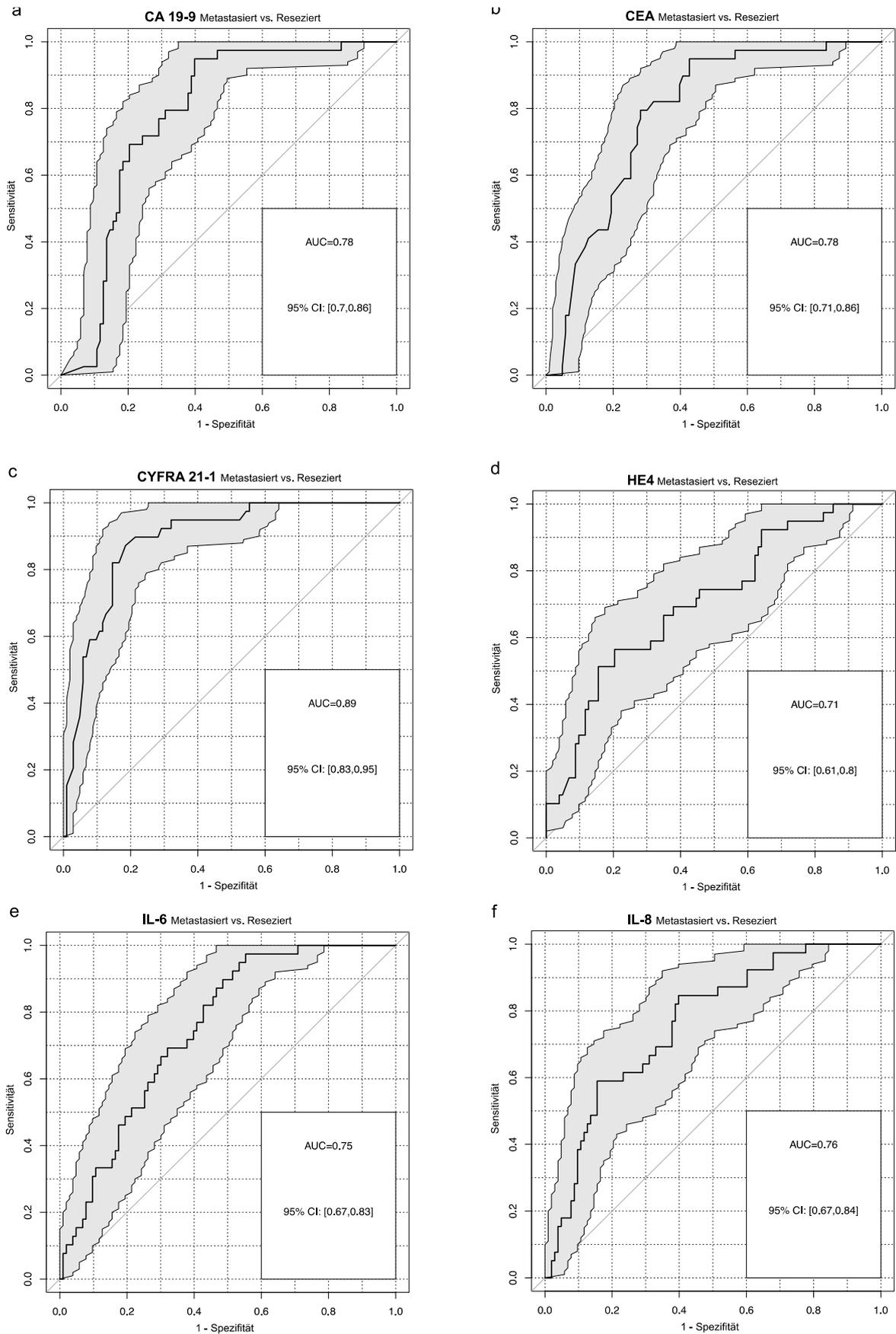


Abbildung 13: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven und Area under the curve (AUC)-Analyse zur Darstellung möglicher Unterschiede der Biomarker-Serumkonzentrationen zwischen Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und Patienten post Tumorresektion



4.6 Prognostische Analysen

In univariaten Cox-Regressionsanalysen wurden klinische Faktoren auf ihre Korrelation mit dem Überleben der Patienten und damit ihre prognostische Wertigkeit untersucht. Die Untersuchung erfolgte für die einzelnen Kohorten separat.

Bei den Patienten nach Tumorresektion in kurativer Intention zeigte sich ein signifikantes Ergebnis für das *Grading* des Tumorresektats (Tabelle 12). Betrachtet man das *Grading* in ordinalskaliertes Ausprägung, beträgt die Hazard Ratio 3,44. In binärer Betrachtung ist bei einem *Grading* von G3 verglichen mit G1 und G2 das relative Risiko in ähnlichem Ausmaß erhöht mit einer Hazard Ratio von 3,45 ($p=0,015$).

Tabelle 12: Prognostischer Wert klinischer Parameter bei Patienten post Tumorresektion in kurativer Intention

	<i>Univariate Analyse</i>		
	HR	95 % CI	p-Wert
Alter > 65 Jahre	0,90	(0,41-1,99)	0,802
Geschlecht weiblich	0,90	(0,40-2,04)	0,803
ECOG > 0	1,34	(0,49-3,71)	0,569
Grading	3,44	(1,36-8,68)	0,009*
Grading > G2	3,45	(1,28-9,31)	0,015*
UICC > IIA	1,64	(0,65-4,13)	0,291
Resektionsstatus R > 0	1,72	(0,73-4,04)	0,214

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zeigte die Untersuchung der klinischen Parameter Alter, Geschlecht, ECOG und Kombinationstherapie- (vs. Monotherapie) lediglich eine signifikante Korrelation des *ECOG Performance Status* mit der Überlebenswahrscheinlichkeit (Tabelle 13). Bei Patienten mit einem ECOG > 0 betrug die Hazard Ratio 0,10. Das Resultat dieser univariaten Analyse besagt, ein höherer ECOG entsprechend einem schlechteren klinischen Performance Status mit einem um 90 % reduziertem Risiko zu versterben assoziiert sei, was aus klinischer Sicht fraglich erscheint. Bei genauerer Betrachtung der Studiengruppe von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zeigte sich, dass 12 Patienten einen ECOG 0 aufwiesen, 5 Patienten einen ECOG 1 und bei 3 Patienten war kein *ECOG Performance Status* erfasst. Das Verhältnis der Patienten, welche im Verlauf eine Tumorresektion nach erfolgter neoadjuvanter Chemotherapie erhielten, betrug bei den Patienten mit ECOG 0 nur 25 % (3 der 12 Patienten), bei den Patienten mit ECOG 1 dahingegen 80 % (4 der 5 Patienten). Daher ist eine Verzerrung aufgrund eines prognostischen Einflusses durch die Tumorresektion sowie aufgrund der geringen hier verglichenen Patientenzahl zu diskutieren. Aufgrund des numerisch signifikanten, aber klinisch fraglichen Resultats wurde der *ECOG Performance Status* in der multivariaten Analyse nicht berücksichtigt.

Tabelle 13: Prognostischer Wert klinischer Parameter bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

	<i>Univariate Analyse</i>		
	HR	95 % CI	p-Wert
Alter > 65 Jahre	0,82	(0,32-2,15)	0,690
Geschlecht weiblich	0,71	(0,26-1,95)	0,511
ECOG > 0	0,10	(0,01-0,78)	0,028*
Kombinationstherapie (vs. Monotherapie)	2,03	(0,45-9,20)	0,358

Bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom zeigte sich keine signifikante Korrelation der untersuchten klinischen Parameter mit der Überlebenswahrscheinlichkeit (Tabelle 14).

Tabelle 14: Prognostischer Wert klinischer Parameter bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom

	<i>Univariate Analyse</i>		
	HR	95 % CI	p-Wert
Alter > 65 Jahre	1,16	(0,78-1,74)	0,460
Geschlecht weiblich	1,16	(0,77-1,75)	0,480
ECOG > 0	1,28	(0,79-2,06)	0,323
Kombinationstherapie (vs. Monotherapie)	0,81	(0,51-1,29)	0,369

Nach Untersuchung der prognostischen Relevanz der klinischen Parameter wurde in den folgenden univariaten Cox-Regressionsanalysen die Korrelation von Biomarker-Serumkonzentrationen mit dem Überleben untersucht. Diese ergaben für die Patienten nach Tumorresektion ein signifikant erhöhtes relatives Risiko zu versterben bei höheren Konzentrationen von CYFRA 21-1 und IL-10 (HR 1,49 mit 95 % CI 1,17-1,89 und HR 1,43 mit 95 % CI 1,09-1,87; jeweils $p < 0,001$) (Tabelle 15). In der lokal fortgeschrittenen Gruppe korrelierten höhere Serumkonzentrationen von CA 19-9 und IL-10 mit einem kürzeren Überleben (HR 1,001 mit 95 % CI 1,0002-1,002 und HR 7,74 mit 95 % CI 1,43-41,84; jeweils $p = 0,017$) (Tabelle 16). Bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom zeigte sich in der univariaten Cox-Regressionsanalyse eine signifikante Korrelation mit dem Überleben für die am besten etablierten Tumormarker CA 19-9 und CEA sowie für CYFRA 21-1 (HR 1,00001 mit 95 % CI 1,00001-1,00002, $p = 0,0001$ und HR 1,002 mit 95 % CI 1,0004-1,004, $p = 0,019$ und HR 1,004, 95 % CI 1,001-1,006, $p = 0,003$). Für IL-10 zeigte die Cox-Regressionsanalyse in der metastasierten Gruppe, im Gegensatz zu den anderen beiden Patientengruppen, keine Korrelation mit der Prognose (Tabelle 17).

Tabelle 15: Prognostischer Wert der Biomarker-Serumlevel bei Patienten post Tumorresektion in kurativer Intention

Univariate Analyse

	HR	95 % CI	p-Wert
CA 19-9 (U/ml)	1,0011	(0,9978-1,0043)	0,519
CEA (ng/ml)	1,1606	(0,9523-1,4146)	0,140
CYFRA 21-1 (ng/ml)	1,4896	(1,1727-1,8923)	0,001*
HE4 (pmol/l)	0,9974	(0,9875-1,0074)	0,614
IFN- γ (pg/ml)	0,9848	(0,9316-1,0410)	0,589
IL-10 (pg/ml)	1,4254	(1,0885-1,8666)	0,010*
IL-6 (pg/ml)	1,1223	(0,7417-1,6981)	0,585
IL-8 (pg/ml)	1,0185	(0,9964-1,0410)	0,102
TNF- α (pg/ml)	1,3092	(0,9906-1,7302)	0,058
PD-1 (ng/ml)	0,8095	(0,5064-1,2940)	0,377
PD-L1 (ng/ml)	0,0003	(1,92x10 ⁻¹⁰ -435,04)	0,261

Tabelle 16: Prognostischer Wert der Biomarker-Serumlevel bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

	HR	<i>Univariate Analyse</i> 95 % CI	p-Wert
CA 19-9 (U/ml)	1,0010	(1,0002-1,0019)	0,017*
CEA (ng/ml)	0,9902	(0,9058-1,0825)	0,828
CYFRA 21-1 (ng/ml)	1,1467	(0,9258-1,4202)	0,210
HE4 (pmol/l)	0,9995	(0,9922-1,0069)	0,900
IFN- γ (pg/ml)	1,0774	(0,9248-1,2552)	0,339
IL-10 (pg/ml)	7,7385	(1,4312-41,841)	0,017*
IL-6 (pg/ml)	1,2912	(0,9126-1,8269)	0,149
IL-8 (pg/ml)	1,0457	(0,9872-1,1076)	0,128
TNF- α (pg/ml)	1,4388	(0,8198-2,5252)	0,205
PD-1 (ng/ml)	1,0196	(0,7616-1,3650)	0,896
PD-L1 (ng/ml)	9,64x10 ⁻⁸	(2,66x10 ⁻²⁰ -3,50x10 ⁵)	0,274

Tabelle 17: Prognostischer Wert der Biomarker-Serumlevel bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom

	HR	<i>Univariate Analyse</i> 95 % CI	p-Wert
CA 19-9 (U/ml)	1,000014	(1,000007-1,000021)	0,0001*
CEA (ng/ml)	1,0022	(1,0004-1,0040)	0,019*
CYFRA 21-1 (ng/ml)	1,0038	(1,0013-1,0063)	0,003*
HE4 (pmol/l)	1,0008	(0,9998-1,0018)	0,120
IFN- γ (pg/ml)	1,0035	(0,9968-1,0103)	0,307
IL-10 (pg/ml)	1,0088	(0,8215-1,2389)	0,933

IL-6 (pg/ml)	1,0010	(0,9966-1,0054)	0,663
IL-8 (pg/ml)	1,0006	(0,9989-1,0024)	0,476
TNF- α (pg/ml)	1,0064	(0,9971-1,0157)	0,180
PD-1 (ng/ml)	0,9860	(0,9395-1,0347)	0,566
PD-L1 (ng/ml)	0,0586	(0,0003-12,566)	0,300

Die multivariaten Cox-Regressionsanalysen wurde mit den klinischen Parametern und Biomarkern mit signifikanter Hazard Ratio in der univariaten Analyse durchgeführt. Bei Patienten nach Tumorresektion des lokal begrenzten Pankreaskarzinoms zeigte das *Grading* des Tumorresektats in paarweiser Betrachtung mit CYFRA 21-1 und IL-10 eine von den beiden Biomarkern unabhängige Korrelation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (Tabelle 18).

Im multivariaten Cox-Regressionsmodell ergab sich weiterhin ein signifikanter p -Wert für CYFRA 21-1 bei den Patienten nach Tumorresektion (HR 1,37 mit 95 % CI 1,06-1,77, $p=0,015$) und für IL-10 bei den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Tumor (HR 10,01 mit 95 % CI 1,58-63,19, $p=0,014$) (Tabelle 18 und 19).

Die multivariate Analyse von CA 19-9, CEA und CYFRA 21-1 bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom ergab ein signifikantes Resultat für CA 19-9 und CYFRA 21-1 (HR 1,00001 mit 95 % CI 1,000003-1,00002, $p=0,008$ und HR 1,004 mit 95 % CI 1,0008-1,006, $p=0,010$) (Tabelle 20).

Tabelle 18: Multivariate Analyse des prognostischen Wertes von CYFRA 21-1, IL-10 und *Grading* bei Patienten post Tumorresektion in kurativer Intention

	HR	<i>Multivariate Analyse</i> 95 % CI	p -Wert
CYFRA 21-1 (ng/ml)	1,36	(1,05-1,76)	0,020*
Grading	2,87	(1,11-7,39)	0,029*

	HR	<i>Multivariate Analyse</i> 95 % CI	p -Wert
IL-10 (pg/ml)	1,39	(1,07-1,81)	0,015*
Grading	3,34	(1,32-8,43)	0,011*

	HR	<i>Multivariate Analyse</i> 95 % CI	p -Wert
CYFRA 21-1 (ng/ml)	1,37	(1,06-1,77)	0,015*
IL-10 (pg/ml)	1,29	(0,94-1,76)	0,112

Tabelle 19: Multivariate Analyse des prognostischen Wertes von CA 19-9 und IL-10 bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Multivariate Analyse

	HR	95 % CI	p-Wert
CA 19-9 (U/ml)	1,0004	(0,9999-1,0009)	0,081
IL-10 (pg/ml)	10,007	(1,5848-63,188)	0,014*

Tabelle 20: Multivariate Analyse des prognostischen Wertes von CA 19-9, CEA und CYFRA 21-1 bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom

	HR	Multivariate Analyse 95 % CI	p-Wert
CA 19-9 (U/ml)	1,000011	(1,0000030-1,0000199)	0,008*
CEA (ng/ml)	1,0011	(0,9989-1,0033)	0,344
CYFRA 21-1 (ng/ml)	1,0035	(1,00083-1,0062)	0,010*

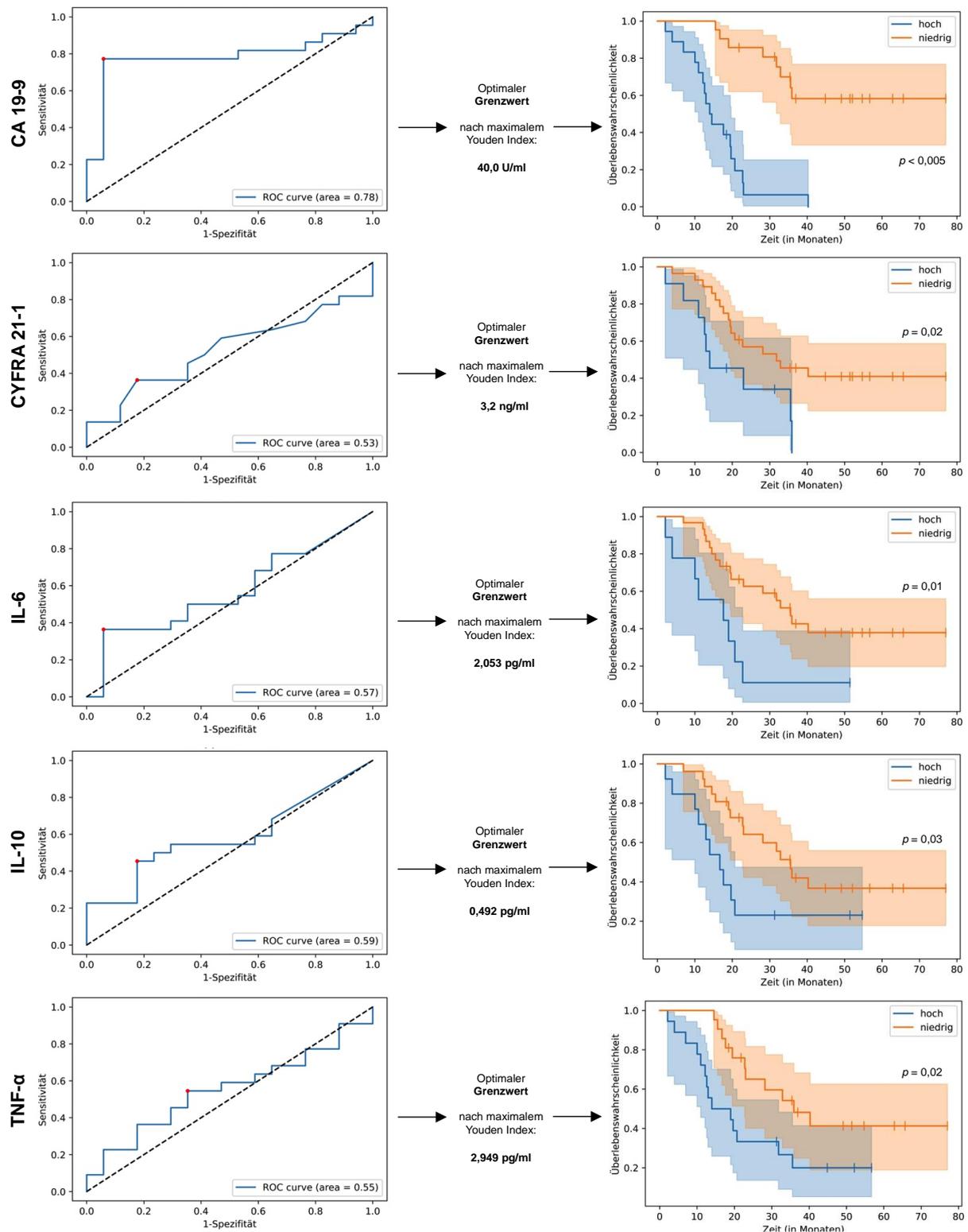
Die folgende Analyse zeigt einen systematischen Ansatz zur Festlegung von Biomarker-Grenzwerten zur Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Bei den Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom konnten die mittels ROC-Kurve und Youden-Index berechneten Grenzwerte von CA 19-9 (1067 U/ml), CEA (8,4 ng/ml), CYFRA 21-1 (12,5 ng/ml), HE4 (82,2 pmol/l), IFN- γ (3,3 pg/ml), IL-6 (3,3 pg/ml), IL-8 (29,65 pg/ml) und PD-L1 (0,008 ng/ml) zwischen jeweils zwei Subgruppen mit einem signifikanten Überlebensunterschied diskriminieren (Abbildung 16).

Für die Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zeigte sich anhand der ermittelten Grenzwerte für CYFRA 21-1 (3,6 ng/ml), IFN- γ (2,90 pg/ml), IL-10 (0,58 pg/ml) und IL-8 (19,55 pg/ml) ein signifikanter Unterschied in den Überlebenskurven zwischen Patienten mit Serumkonzentrationen oberhalb und unterhalb der jeweiligen Grenzwerte (Abbildung 15).

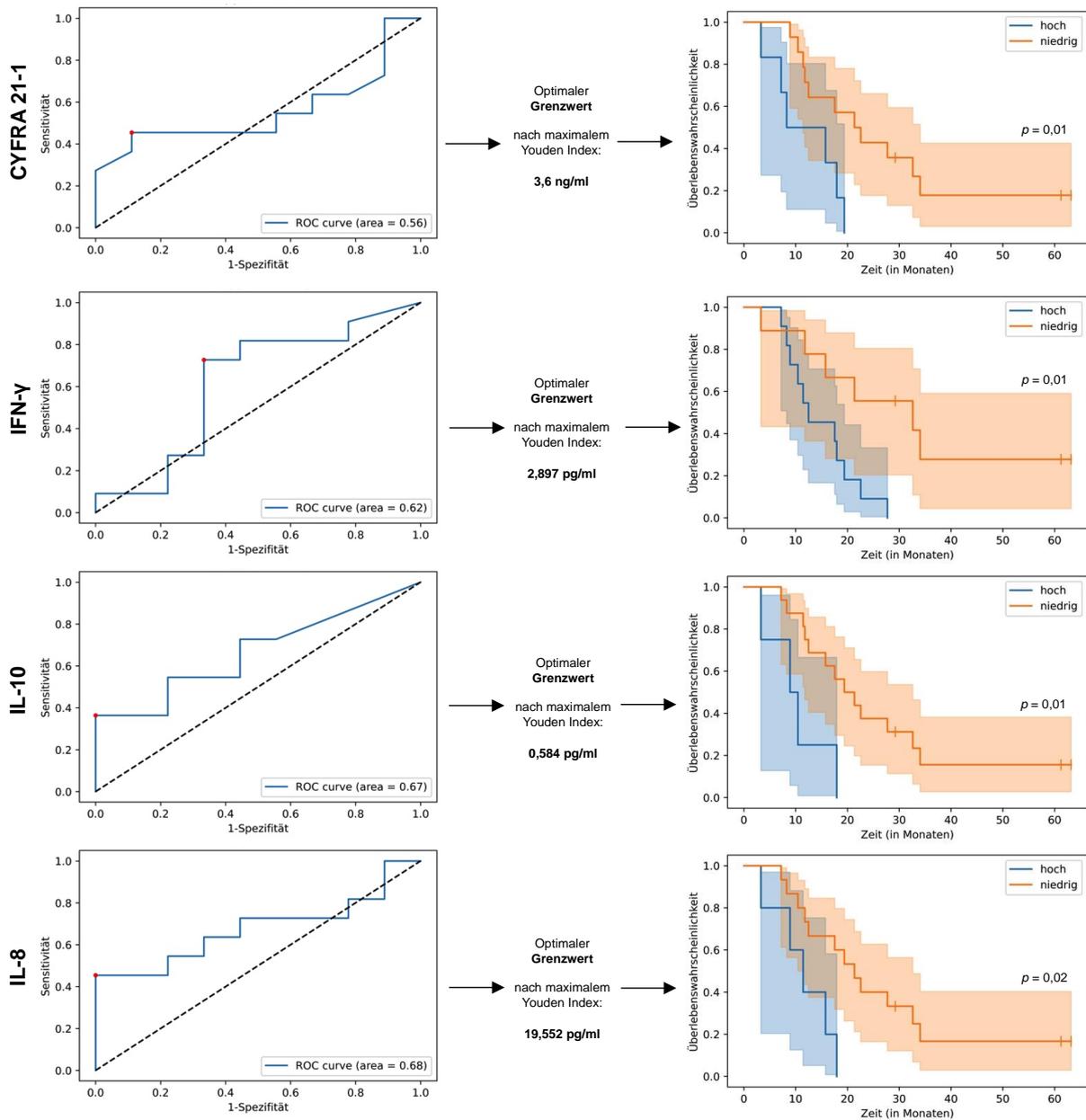
Interessanterweise zeigte sich auch bei den Patienten nach kurativ intendierter Tumorresektion ein signifikanter Unterlebensvorteil für die Patienten mit postoperativen Serumkonzentrationen von CA 19-9, CYFRA 21-1, IL-6, IL-10, TNF- α unterhalb des Grenzwertes verglichen mit Patienten, welche Serumkonzentrationen oberhalb des Grenzwertes aufwiesen. Der berechnete Grenzwert betrug für CA 19-9 40,0 U/l, für CYFRA 21-1 3,2 ng/ml, für IL-6 2,05 pg/ml, für IL-10 0,49 pg/ml und für TNF- α 2,95 pg/ml (Abbildung 14).

Abbildung 14: Post Tumorresektion in kurativer Intention: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven und Youden-Index für die Festlegung eines Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentration zur Unterscheidung von Patienten mit einer längeren oder kürzeren Überlebenszeit als das gruppenspezifische mediane Überleben



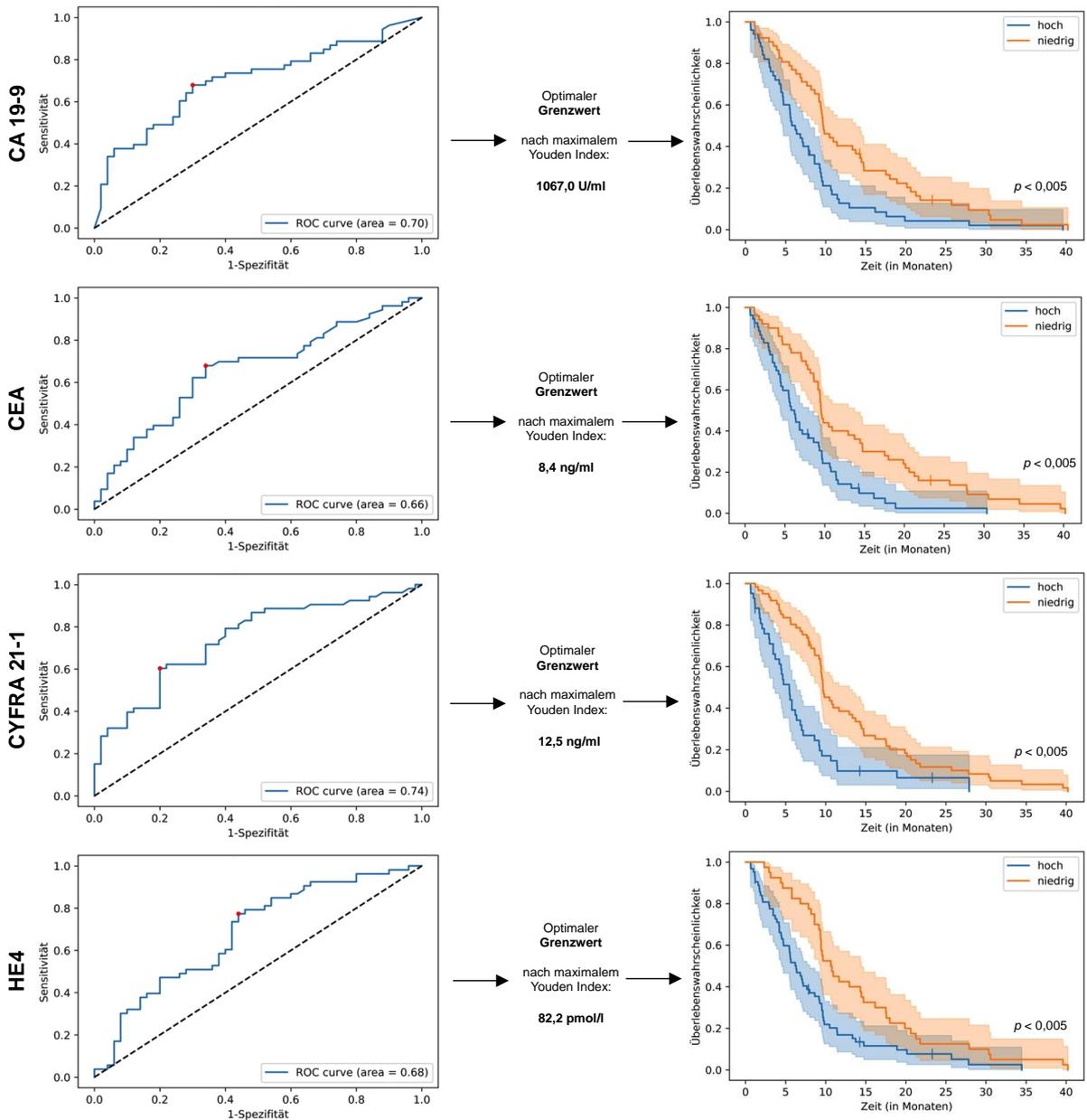
Die ROC-Kurven zeigen die *True Positive Rate* (Sensitivität) versus die *False Positive Rate* (1-Spezifität) unter Annahme verschiedener Biomarker-Grenzwerte. Die Grenzwerte mit maximaler Sensitivität und Spezifität wurden mittels maximalem Youden-Index ermittelt und sind als roter Punkt markiert. Kaplan-Meier-Kurven und der mittels *Log-rank test* ermittelte p -Wert für einen Unterschied in den Überlebenskurven zwischen Patienten mit Serumkonzentrationen oberhalb und Patienten mit Serumkonzentrationen unterhalb des Grenzwertes sind dargestellt.

Abbildung 15: Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven und Youden-Index für die Festlegung eines Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentration zur Unterscheidung von Patienten mit einer längeren oder kürzeren Überlebenszeit als das gruppenspezifische mediane Überleben



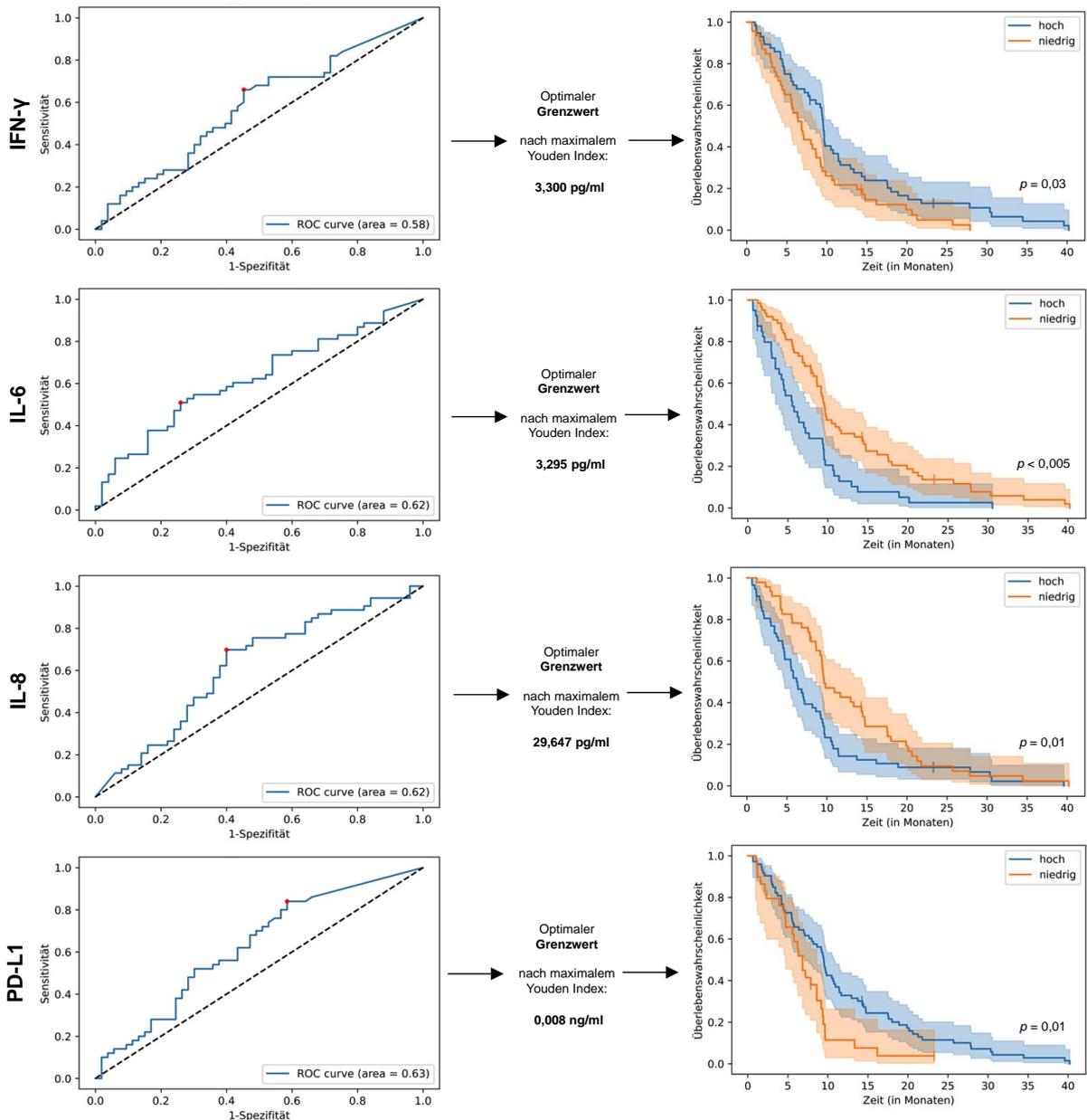
Die ROC-Kurven zeigen die *True Positive Rate* (Sensitivität) versus die *False Positive Rate* (1-Spezifität) unter Annahme verschiedener Biomarker-Grenzwerte. Die Grenzwerte mit maximaler Sensitivität und Spezifität wurden mittels maximalem Youden-Index ermittelt und sind als roter Punkt markiert. Kaplan-Meier-Kurven und der mittels *Log-rank test* ermittelte p -Wert für einen Unterschied in den Überlebenskurven zwischen Patienten mit Serumkonzentrationen oberhalb und Patienten mit Serumkonzentrationen unterhalb des Grenzwertes sind dargestellt.

Abbildung 16: Metastasiertes Pankreaskarzinom: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven und Youden-Index für die Festlegung eines Grenzwertes der Biomarker-Serumkonzentration zur Unterscheidung von Patienten mit einer längeren oder kürzeren Überlebenszeit als das gruppenspezifische mediane Überleben



(Fortsetzung der Abbildung auf der folgenden Seite)

Fortsetzung der Abbildung von der vorherigen Seite:

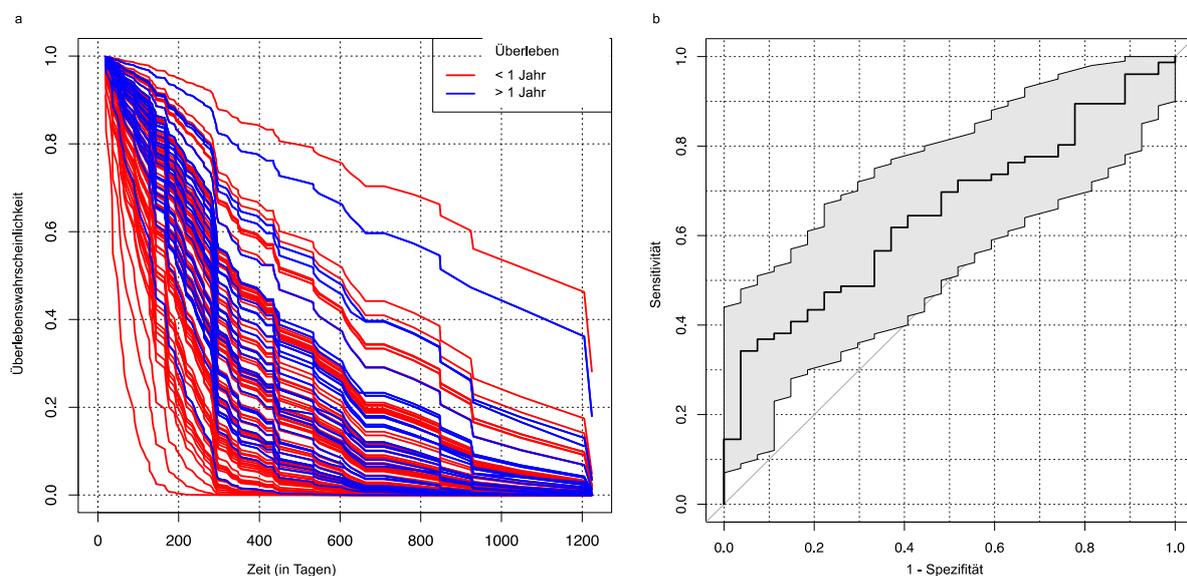


Die ROC-Kurven zeigen die *True Positive Rate* (Sensitivität) versus die *False Positive Rate* (1-Spezifität) unter Annahme verschiedener Biomarker-Grenzwerte. Die Grenzwerte mit maximaler Sensitivität und Spezifität wurden mittels maximalem Youden-Index ermittelt und sind als roter Punkt markiert. Kaplan-Meier-Kurven und der mittels *Log-rank test* ermittelte p -Wert für einen Unterschied in den Überlebenskurven zwischen Patienten mit Serumkonzentrationen oberhalb und Patienten mit Serumkonzentrationen unterhalb des Grenzwertes sind dargestellt.

4.7 Prognostische Modelle

Zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei den fernmetastasierten Patienten anhand einer Kombination der Serumkonzentrationen CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PD-1, PD-L1 wurden ein Cox-Regressionsmodell und ein *Random Forest* Modell erstellt. Die ROC-Kurve zur Vorhersage des tatsächlichen 1-Jahres-Überlebens der Patienten anhand der im Cox-Regressionsmodell ermittelten Überlebenswahrscheinlichkeit bei 365 Tagen zeigt einen AUC-Wert von 0,652 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,541 bis 0,762 (Abbildung 17b). Die Koeffizienten der Biomarker im Cox-Regressionsmodell sind in Tabelle 21 dargestellt.

Abbildung 17: Cox-Regressionsmodell anhand einer Kombination der Serumkonzentrationen von CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PD-1 und PD-L1 zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom



a) Im Cox-Regressionsmodell erstellte individuelle Überlebenskurven mit farbiger Darstellung von Patienten mit einem tatsächlichen Überleben <365 Tagen (rot) bzw. >365 Tagen (blau). b) ROC-Kurve zur Vorhersage des tatsächlichen 1-Jahres-Überlebens der Patienten anhand der im Cox-Regressionsmodell ermittelten Überlebenswahrscheinlichkeit bei 365 Tagen.

Tabelle 21: Koeffizienten der Biomarker im Cox-Regressionsmodell zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom

Biomarker	Koeffizient
CYFRA 21-1 (ng/ml)	0,724970236
IL-6 (pg/ml)	0,651736751
HE4 (pmol/l)	0,273484916
CEA (ng/ml)	0,183751704
CA 19-9 (U/ml)	0,164873948
IFN- γ (pg/ml)	0,154870346
PD-1 (ng/ml)	0,043626591
TNF- α (pg/ml)	-0,017607229
IL-10 (pg/ml)	-0,320820791

PD-L1 (ng/ml)	-0,412245188
IL-8 (pg/ml)	-0,512075686

Im *Random Forest* Modell zeigt die mittlere ROC-Kurve eine AUC von 0,66 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,464 bis 0,856 (Abbildung 18). Die 5 unterschiedlichen ROC-Kurven und AUC-Werte ergeben sich hier aus der *k-fold* Validierung ($k=5$). Die Gewichtung der einzelnen Faktoren im *Random Forest* Modell ist in Tabelle 22 dargestellt.

Abbildung 18: *Random Forest* Modell anhand einer Kombination der Serumkonzentrationen von CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PD-1 und PD-L1 zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom

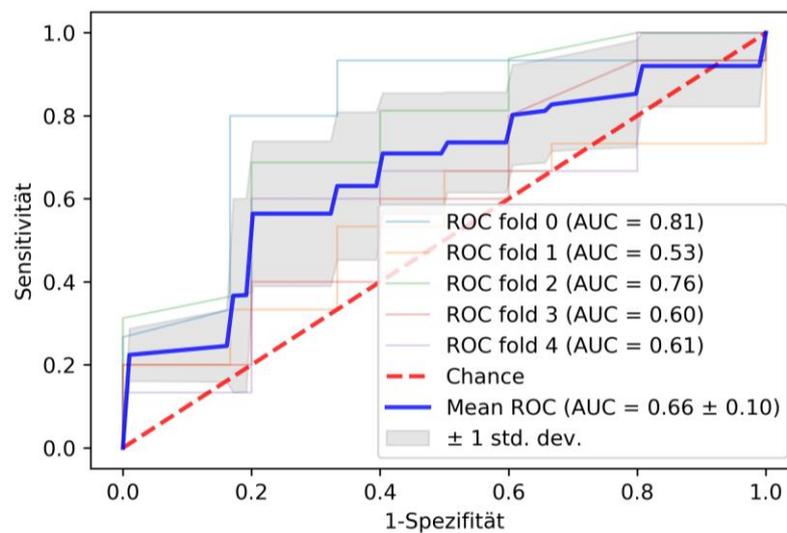


Tabelle 22: Gewichtung der Biomarker im *Random Forest* Modell

Biomarker	Gewichtung
PD-1	0,117671397
CEA	0,117230163
IL-8	0,113959288
CA 19-9	0,108951341
HE4	0,091719248
CYFRA 21-1	0,090057564
IL-6	0,088851606
TNF- α	0,085520351
IFN- γ	0,078928305
PD-L1	0,067679967
IL-10	0,039430770

5 Diskussion

5.1 Repräsentativität des Studienkollektivs

Die klinischen Charakteristika und Überlebenszeitanalysen sind vor der Frage der Repräsentativität des Studienkollektivs zu betrachten. Da die Studie monozentrisch durchgeführt wurde und ausschließlich in einem universitären Tumorzentrum behandelte Patienten umfasste, ist ein Selektionsbias denkbar.

Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses lag in allen drei Studiengruppen unter dem mittleren Erkrankungsalter beim Pankreaskarzinom in Deutschland (Robert Koch-Institut 2021). Die überwiegende Tumorklassifikation im Pankreaskopf bei Patienten mit lokal begrenztem, reseziertem und bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom im Gegensatz zur mehrheitlichen Tumorklassifikation im Pankreaskörper und/oder Pankreasschwanz bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom ist damit vereinbar, dass bei im Pankreaskörper und/oder Pankreasschwanz lokalisierten Karzinomen die klinische Manifestation und damit die Diagnosestellung häufig erst später und in weiter fortgeschrittenem Stadium erfolgt (Barreto, Shukla, and Shrikhande 2010). Entsprechend der bekannten histologischen Verteilung waren auch in unserer Studienpopulation das duktales Adenokarzinom und verwandte Subtypen duktaler Differenzierung mit 94-95 % als häufigste histologische Typen zu identifizieren. Ein Azinuszellkarzinom wiesen zwei Patienten mit fernmetastasiertem Tumor und ein Patient mit reseziertem Tumor auf. Schmidt et al. konnten in einer großen retrospektiven Analyse eine bessere Prognose des Azinuszellkarzinoms verglichen mit dem duktalem Adenokarzinom im Falle einer Tumoresektion zeigen (Schmidt et al. 2008). Insgesamt gibt es kaum Studien mit großer Fallzahl zu diesem histologischen Subtyp des Pankreaskarzinoms aufgrund seiner Seltenheit. Auf eine Berücksichtigung des histologischen Typs in den prognostischen Analysen im Sinne einer Subanalyse wurde aufgrund der sehr geringen Fallzahl von Azinuszellkarzinomen in unserer Studie verzichtet.

Die Veränderungen der Studienlage und Therapieempfehlungen über den Studienzeitraum von 2011 bis 2020 sind zu beachten. Die adjuvante Chemotherapie nach kurativ intendierter, primärer Tumoresektion bestand bei der überwiegenden Mehrheit von 92 % in einer Gemcitabin-Monotherapie, da dies der leitliniengerechten Therapie während des Großteils der Studienzeit entsprach (Seufferlein et al. 2013). Entsprechend der im Jahr 2021 veröffentlichten Leitlinie besteht die aktuelle Empfehlung der adjuvanten Chemotherapie in mFOLFIRINOX bei einem *ECOG Performance Status* von 0-1 und Gemcitabin oder Gemcitabin plus Capecitabin bei *ECOG Performance Status* >1 (Deutsche Krebsgesellschaft 2021). Die untersuchten Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom erhielten leitliniengerecht mehrheitlich eine 5FU-basierte Kombinationstherapie. Da sich die Auswahl der Chemotherapie beim metastasierten Pankreaskarzinom nach Performance-Status und Komorbiditäten des Patienten richtet, lässt sich bei dieser Patientengruppe eine ausgeglichene Verteilung der Chemotherapieregime feststellen.

Die medianen Überlebenszeiten von 28,16 Monaten bei Patienten nach kurativ intendierter Tumoresektion, 17,96 Monaten bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und 8,61 Monaten bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom sind konsistent mit der in der Literatur

beschriebenen Prognose (Neoptolemos et al. 2017; Kunzmann et al. 2021; Von Hoff et al. 2013), sodass das Patientenkollektiv der Studie insgesamt als repräsentativ zu bewerten ist.

Während bei verschiedenen Tumorentitäten eine Assoziation zwischen einem verlängerten Zeitintervall bis zum Therapiebeginn und einer schlechten Prognose belegt ist (Neal et al. 2015), konnte dies für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom bisher nicht gezeigt werden (Kruger et al. 2020). Angesichts des sehr schnell fortschreitendem Tumorwachstum beim Pankreaskarzinoms wird weiterhin eine rasche Therapieeinleitung angestrebt und als prognostisch sinnvoll erachtet. Dies spiegelt sich in den Einschlusskriterien dieser Studie mit einem Beginn der Chemotherapie innerhalb von 30 Tagen nach Studieneinschluss wider. Eine adjuvante Chemotherapie soll leitliniengerecht und basierend auf den Resultaten der ESPAC-3-Studie möglichst innerhalb von 12 Wochen nach Operation eingeleitet werden (Valle et al. 2014). In der vorliegenden Studie betrug die Zeit von der Tumorresektion bis zum Beginn der adjuvanten Chemotherapie im Median rund 8 Wochen (57 Tage), ein Zeitintervall von bis zu 12 Wochen bis zur adjuvanten Chemotherapie wies der Großteil der Patienten (87,2 %) auf.

Bezüglich des Zeitpunkts der Serumgewinnung ist zu beachten, dass die Serumprobenentnahme bei den Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom nach Tumorresektion erfolgte. Für den beim Pankreaskarzinom am besten untersuchten Tumormarker CA 19-9 zeigen Studien, welche die Assoziation sowohl präoperativer als auch postoperativer Serumlevel mit der Überlebenszeit analysierten, die prognostische Überlegenheit postoperativ bestimmter Werte (Ferrone et al. 2006; Kondo et al. 2010; Hata et al. 2012). Hinsichtlich der untersuchten Cytokine sind jedoch postoperativ bedingte Veränderungen als mögliche methodische Limitation zu bedenken. Patienten nach großen chirurgischen Eingriffen am Gastrointestinaltrakt zeigen eine postoperative Zunahme von IL-6, IL-8 und IL-10 mit dem Maximum am 1. postoperativen Tag und sukzessiver Abnahme bis zum 7. postoperativen Tag (Rettig et al. 2016; Okamura et al. 2015). In der vorliegenden Studie erfolgte die Gewinnung der Serumprobe frühestens 29 Tage und im Median 54 Tage nach operativer Tumorresektion, sodass ein mehrwöchiges postoperatives Zeitintervall besteht. Residuale durch operative Gewebeschäden bedingte Veränderungen der inflammatorischen Cytokine sind jedoch nicht auszuschließen.

5.2 Niedrige Serumlevel der Cytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p70 und IL-13

Angesichts der begrenzten Verfügbarkeit von Serummaterial verwendeten wir einen kommerziellen Multiplex-Assay zur Bestimmung inflammatorischer Cytokine. Bei den Cytokinen IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p70 und IL-13 lagen mehr als 95 % der Messergebnisse unterhalb der testspezifischen Quantifikationsgrenze, sodass sie in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt wurden. Auch andere Arbeiten zu serologischen Untersuchungen von Cytokinen bei Patienten mit Pankreaskarzinom zeigten Expressionslevel im niedrigen pg/ml-Bereich. In einer Studie mit 73 Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom zeigte IL-12p70 ebenfalls Messergebnisse unterhalb der Quantifikationsgrenze, und IL-13 Messergebnisse mit einem Median von 0,0 pg/ml und einem Mittelwert von 0,6 pg/ml, welche mit dem von uns verwendeten Assay angesichts dessen höherer unterer Quantifikationsgrenze von 4,21 pg/ml vermutlich überwiegend nicht quantifizierbar wären (Farren et al. 2016). Für serologische IL-13 Konzentrationen beim Pankreaskarzinom sind unter Anwendung verschiedener kommerzieller

Multiplex-Assays sowohl signifikant höhere als auch niedrigere Werte verglichen mit gesunden Probanden beschrieben, sodass sich ein inkonsistentes Bild für IL-13 beim Pankreaskarzinom ergibt (Gabitass et al. 2011; Bellone et al. 2006). In einer Studie mit 60 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, welche mit einer Gemcitabin-Monotherapie behandelt wurden, wurde für die Cytokinmessungen ein Multispot-Assay des gleichen Herstellers wie in unserer Studie angewendet. Interessanterweise wurde hier neben IL-6 auch IL-1 β als negativer prognostischer Faktor in Bezug auf das Gesamtüberleben identifiziert. Auch wenn die Verteilung der Serumkonzentrationen in Bezug auf die Quantifikationsgrenzen nicht genau beschrieben wird, deuten die angegebenen Mediane von 0,0 pg/ml für IL-1 β und IL-2 darauf hin, dass - ähnlich wie in unserer Studie - auch in dieser Studie ein Großteil der Messwerte für IL-1 β und IL-2 unterhalb der bei uns geltenden Quantifikationsbereiche liegt (Mitsunaga et al. 2013). Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie mit präoperativen Cytokinmessungen bei 287 Patienten mit resektablem Pankreaskarzinom unter Anwendung eines anderen Multispot-Assay deutlich höhere mediane Serumkonzentrationen für IL-1 β (5,255 pg/ml) und IL-4 (7,42 pg/ml) und identifiziert IL-1 β und IL-4 als negative prognostische Faktoren (Piro et al. 2017).

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass IL-12p70 auch in anderen Pankreaskarzinom-Studien serologisch nicht messbar war und die untere Quantifikationsgrenze für IL-13 in dem von uns verwendeten Assay höher ist als die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen. Die beim Pankreaskarzinom beschriebenen Serumkonzentrationen für IL-1 β , IL-2 und IL-4 sind sehr heterogen (Farren et al. 2016; Mitsunaga et al. 2013; Piro et al. 2017). Mögliche Gründe könnten die von verschiedenen Herstellern angewendeten Assays oder die Präanalytik darstellen. Die ergänzende Verwendung eines weiteren Assays mit einem breiterem Quantifikationsbereich könnte sinnvoll sein, um die prognostische Wertigkeit der in dieser Studie ausgeschlossenen Cytokine beim Pankreaskarzinom weiter zu untersuchen.

5.3 Korrelationen der Biomarker

Nachdem bei gesunden Probanden ohne Malignomerkkrankung eine positive Korrelation von Alter und HE4-Serumkonzentrationen in der Literatur konsistent beschrieben wird (Bolstad et al. 2012; Hertlein et al. 2012; Moore et al. 2012), bestand auch in der dieser Studie eine schwache, jedoch signifikante Korrelation zwischen dem Patientenalter und der Serumkonzentration von HE4. Des Weiteren ist eine Altersabhängigkeit der Serumkonzentrationen von TNF- α und IL-6 bei gesunden Menschen bekannt (Rea et al. 2018), welche sich in der vorliegenden Studie bei Patienten mit Pankreaskarzinom nur für TNF- α , jedoch nicht für IL-6 feststellen ließ.

Die größte Korrelation der Serumkonzentrationen zeigte sich zwischen den Biomarkern CYFRA 21-1 und IL-8 mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von 0,6. Eine ähnlich starke Korrelation ist in einer Studie von Patienten mit kolorektalem Karzinom beschrieben (Dressen et al. 2017). Übereinstimmend mit anderen Studien konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen serologischem PD-1 und PD-L1 mit einem Spearman-Rangkoeffizient von 0,51 zeigen ($p < 0,001$) (Kruger et al. 2017; Bian et al. 2019). Diese Korrelation kann auf einem biologischen Zusammenhang hinweisen, welcher jedoch im Hinblick auf die Herkunft und Regulation des löslichen PD-1 und PD-L1 noch nicht erklärt ist.

5.4 Unterschiede der Serumkonzentrationen der Biomarker zwischen Patienten mit reseziertem, lokal fortgeschrittenem und metastasiertem Pankreaskarzinom

Wie erwartet, zeigten sich signifikante Unterschiede einiger Biomarker zwischen Patienten mit metastasiertem Tumorleiden und Patienten nach Tumorresektion: CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6 und IL-8 ergaben in der ROC-Analyse ein signifikantes Resultat. CYFRA 21-1 zeigte dabei die beste Diskriminationsfähigkeit zwischen diesen beiden Studiengruppen. Erstaunlicherweise zeigte sich zwischen den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Tumorleiden und Patienten nach Tumorresektion lediglich ein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen für CEA. Hier könnte jedoch aufgrund der geringen Fallzahl der beiden kleineren Studiengruppen eine zu geringe Teststärke vorliegen um weitere signifikante Unterschiede zu erkennen. Zwischen den Patienten mit metastasiertem und lokal fortgeschrittenem Tumor konnten interessanterweise ebenfalls CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6 und IL-8 signifikant unterscheiden mit dem besten Diskriminationspotential zwischen den beiden Patientengruppen von CYFRA 21-1 und IL-8.

IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden mit Auswirkung auf Angiogenese und Zellproliferation (Waugh and Wilson 2008). *In vitro* Untersuchungen an Pankreaskarzinomzellen zeigten, dass von Tumorzellen exprimiertes IL-8 als autokriner Wachstumsfaktor die Tumorzellproliferation fördert (Kamohara et al. 2007) und dass IL-8 eine gesteigerte Expression wichtiger angiogenetischer Faktoren (wie VEGF, Neuropilin 2 und VEGF-R) und eine gesteigerte Aktivität von die Zellproliferation begünstigenden Proteinkinasen bewirkt (Li et al. 2008). Die Produktion von IL-8 durch Pankreaskarzinomzellen sowie die Korrelation von IL-8 mit Tumorprogression und Metastasierungspotential könnten dem signifikanten Unterschied von serologischen IL-8 Konzentrationen beim lokal fortgeschrittenen und metastasiertem Pankreaskarzinom in dieser Studie zugrunde liegen (Xie 2001; Matsuo et al. 2004; Sclabas et al. 2005).

Aus dem Diskriminationspotential von serologischem CYFRA 21-1 und IL-8 zwischen Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom in unserer Kohorte ergibt sich die Fragestellung, ob CYFRA 21-1 und IL-8 in die Beurteilung des *Stagings* miteinbezogen werden sollten.

5.5 Prognostische Analysen

Das *Grading* als unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit Tumorresektion konnte in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten bestätigt werden (Luttges et al. 2000; Wasif et al. 2010).

Bezüglich der prognostischen Wertigkeit der beim Pankreaskarzinom etablierten Biomarkern zeigte sich folgende Beobachtung: Während der Einsatz von prognostischen Biomarkern in der klinischen Routine unabhängig vom Tumorstadium erfolgt, zeigten in dieser Studie die gleichen Biomarker einen unterschiedlichen prognostischen Wert bei den Patienten nach Tumorresektion, mit lokal fortgeschrittenem und metastasiertem Pankreaskarzinom. Daraus ergibt sich die Frage, ob in unterschiedlichem Tumorstadium verschiedene Tumormarker bevorzugt verwendet werden sollten.

In den uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalysen zu den Biomarkern fällt auf, dass die Hazard Ratio oft nahe 1,0 liegt. Dies ist ein statistischer Effekt der Cox-Regressionsmodelle, welche die Hazard Ratio für die Serumkonzentration als kontinuierliche Variable berechnen. Die hier angegebene Hazard Ratio bezieht sich auf die um eine Einheit (z.B. 1 ng/ml bei CEA oder 1 pg/ml bei IL-10) erhöhte Serumkonzentration, sodass die breite Verteilung der Serumkonzentrationen zu Hazard Ratios nahe 1,0 führen kann.

Eine signifikante Assoziation mit einem kürzeren Gesamtüberleben zeigte sich für höhere postoperativ gemessene CYFRA 21-1-Serumkonzentrationen ($p=0,001$) und IL-10-Serumkonzentrationen ($p=0,01$). Auch bei den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zeigte IL-10, neben dem etablierten Tumormarker CA 19-9, eine signifikante Korrelation mit dem Überleben. IL-10 wird meist als antiinflammatorisches Cytokin charakterisiert, jedoch deuten sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte auf eine komplexe immunmodulatorische Wirkung von IL-10. Es hemmt die T-Zell-Aktivierung anhand einer Herabregulation der Antigenpräsentation durch Monozyten und einer Hemmung der IL-2 Synthese (de Waal Malefyt et al. 1991; de Waal Malefyt, Yssel, and de Vries 1993). Stimulatorische Effekte von IL-10 auf T-Zellen umfassen die Proliferation von CD8+ T-Lymphozyten und eine gesteigerte Produktion von IFN- γ (Mumm et al. 2011; Naing et al. 2018). Auf Mastzellen wirkt IL-10 proliferativ und unterdrückt zugleich deren Synthese von IL-6 und TNF- α (Thompson-Snipes et al. 1991; Marshall et al. 1996). IL-10 ist im Tumormikroumfeld bei diversen Tumorentitäten nachgewiesen (Sato et al. 2011) und wird eine immunsuppressive und damit das Tumorstadium begünstigende Wirkung zugeschrieben (Sideras et al. 2014). Beim Pankreaskarzinom ist die Korrelation von erhöhtem serologischem IL-10 und einem kürzerem Gesamtüberleben in verschiedenen Studien beschrieben (Farren et al. 2016). In unserer Studie zeigte sich eine prognostische Relevanz von IL-10 nach Tumorresektion und bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, jedoch nicht bei den Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom.

Beim metastasierten Pankreaskarzinom zeigten die etablierten Biomarker CA 19-9, CEA und CYFRA 21-1, wie zu erwarten, eine signifikante Korrelation mit dem Überleben in der univariaten Cox-Regressionsanalyse. Die signifikante Assoziation von CYFRA 21-1 mit dem Gesamtüberleben sowohl in der resezierten als auch in der metastasierten Studiengruppe blieb in der multivariaten Analyse bestehen. Die Korrelation von CYFRA 21-1 mit dem Gesamtüberleben beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom ist bereits vorgängig durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt worden (Boeck et al. 2013; Haas et al. 2015), während die in der vorliegenden Studie gezeigte prognostische Relevanz von CYFRA 21-1 nach kurativ intendierter Resektion eines Pankreaskarzinoms unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben ist.

In der vorliegenden Studie erfolgte zudem eine systematische Biomarker-Grenzwertbestimmung zur Unterscheidung von Patienten mit besserer bzw. schlechterer Prognose innerhalb der Studiengruppe, da ein arbiträrer Wert wie beispielweise der Median sich von einem optimalen Grenzwert unterscheiden kann und die Anwendung von *Cut-off*-Werten in der klinischen Routine praktikabler ist als eine Beurteilung von Biomarkern als kontinuierliche Variablen.

Bei Patienten nach kurativ intendierter Tumorresektion konnte anhand eines postoperativen CA 19-9-Grenzwertes von 40,0 U/ml unterschieden werden zwischen zwei Patientengruppen mit signifikant unterschiedlicher Überlebensrate und prognostischem Vorteil der Patienten mit einer CA 19-9-Serumkonzentration unterhalb 40,0 U/ml ($p < 0,005$). Ein Überlebensvorteil von Patienten mit niedrigeren postoperativen CA 19-9-Werten nach Pankreaskarzinomresektion ist vielfach beschrieben, wobei in einigen Studien arbiträre *Cut-off*-Werte gewählt werden (Berger et al. 2008; Kinsella et al. 2008; Ferrone et al. 2006), in anderen Studien der Referenzwert 37 U/ml (Hata et al. 2012). Kondo et al. konnten bei mehreren vordefinierten *Cut-off*-Werten (37 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml und 500 U/ml) eine signifikante Korrelation von postoperativem CA 19-9 mit dem Gesamtüberleben nachweisen mit der höchsten statistischen Aussagekraft bei dem *Cut-off*-Wert 37 U/ml (Kondo et al. 2010), wobei der von uns ermittelte Grenzwert von 40,0 U/l nahe an diesem liegt.

TNF- α wies in der vorliegenden Studie kaum prognostische Relevanz auf. Lediglich in der tumorresezierten Studiengruppe ergaben sich zwei signifikant unterschiedliche prognostische Gruppen bei einem postoperativ gemessenen *Cut-off*-Wert von 2,949 pg/ml. Bei Patienten mit Pankreaskarzinomresektion wurde präoperativ gemessenes TNF- α bereits als prognostisch relevant beschrieben (Dima et al. 2012). Dies ist am ehesten Ausdruck einer inflammatorischen Aktivität des Tumors bzw. der Tumormikroumgebung (Roach et al. 2002).

Bei den Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom gelang für die meisten untersuchten Biomarker (CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IL-6, IL-8, IFN- γ und PD-L1) eine Unterscheidung von prognostischen Gruppen anhand des ermittelten *Cut-off*-Wertes.

Bestimmungen von *Cut-off*-Werten erfolgen oft entweder nach statistischen Nennwerten der jeweiligen Kohorte (z.B. nach der medianen Serumkonzentration) oder nach arbiträren Werten, wobei die Strategien zur Auswahl dieser in vielen Studien nicht diskutiert werden. Ein *Cut-off*-Wert stellt immer einen Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität dar. Eine statistische Methode zum Berechnen eines *Cut-off*-Wertes mit bestmöglicher Sensitivität und Spezifität ist das Heranziehen des Youden-Index, welcher hier verwendet wurde. Interessanterweise lag der für CA 19-9 ermittelte *Cut-off*-Wert von 1067,0 U/ml nahe der medianen Serumkonzentration von 971 U/ml in der metastasierten Studiengruppe, welche andere Studien oft als *Cut-off*-Wert heranziehen.

Bei einer HE4-Serumkonzentration oberhalb des ermittelten *Cut-off*-Wertes von 82,2 pmol/l in der metastasierten Studiengruppe zeigte sich eine signifikant schlechtere Überlebenskurve verglichen mit Patienten mit niedrigerem HE-4-Level ($p < 0,005$). Der prognostische Wert des serologischen HE4 bei Patienten mit Pankreaskarzinom ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben, lediglich der Zusammenhang einer erhöhten HE4-Expression im Pankreaskarzinomgewebe mit einem geringeren Überleben (Ohkuma et al. 2021). Für die Bewertung von HE4 als prognostischen Marker ist die Assoziation der HE4-Serumkonzentration mit klinischen Faktoren wie Alter, Rauchen und Nierenfunktion als möglicher Bias zu bedenken (Bolstad et al. 2012; Escudero et al. 2011).

IL-6 ist ein multifunktionales Cytokin und aktiviert bei Rezeptorbindung wichtige Signalwege (wie den JAK-STAT-Signalweg) zur Regulation von Entzündungsprozessen, Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose (Rincon 2012). In der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms sind Effekte von IL-6 sowohl

auf die Tumorzellen als auch die Tumorumgebung beschrieben: Die IL-6 abhängige STAT3-Aktivierung in Pankreaszellen begünstigt die Tumorentstehung, das Tumorwachstum, die Angiogenese und Metastasenbildung (van Duijneveldt, Griffin, and Putoczki 2020). Eine durch IL-6 gehemmte Proliferation dendritischer Zellen in der Tumorumgebung ist hinweisend auf einen Beitrag von IL-6 zur Entstehung eines immunsuppressiven Milieus (Bharadwaj et al. 2007). In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, welche höhere Serumkonzentrationen von IL-6 bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom als prognostisch negativ beschreiben (Mitsunaga et al. 2013; Farren et al. 2016), konnten wir bei den Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom anhand von IL-6 mit einem *Cut-off*-Wert von 3,295 pg/ml zwei prognostisch signifikant unterschiedliche Gruppen identifizieren.

Während bei den meisten Biomarkern über dem Grenzwert liegende Serumkonzentrationen mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren, zeigte sich für IFN- γ und PD-L1 in der metastasierten Studiengruppe eine bessere Prognose bei Konzentrationen oberhalb des *Cut-off*-Wertes. IFN- γ besitzt eine immunmodulatorische Aktivität und wirkt zudem in verschiedene Gewebe und Tumoren antiproliferativ (Dembic 2015). Der inhibitorische Effekt von IFN- γ auf die Proliferation und Migration des Pankreaskarzinoms ist in Zellkulturen und im Mausmodell belegt (Lange et al. 2011; Zhang et al. 2018) und könnte möglicherweise die Assoziation von höheren Serumkonzentrationen mit einem längeren Überleben der Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom erklären. Mehrere Studien belegen die wesentliche Rolle von IFN- γ bei der Antitumoraktivität von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Hall et al. 2016; Savid-Frontera et al. 2022).

Eine hohe PD-L1 Expression im Pankreaskarzinomgewebe scheint mit einer ungünstigen Prognose zu korrelieren (Nomi et al. 2007; Gao et al. 2018). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe ließ sich jedoch keine Korrelation zwischen der PD-L1 Expression im Tumorgewebe und der Serumkonzentration von PD-L1 feststellen und hohe Serumlevel waren prognostisch nicht ungünstig, was in der vorliegenden Studie erneut bestätigt wurde.

5.6 Prognostische Modelle

Die beiden erstellten prognostischen Modelle (Cox-Regressionsmodell und *Random Forest* Modell) sollten anhand einer Kombination der elf Biomarker mit unterschiedlicher Gewichtung eine Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom treffen.

Während Cox-Regressionsmodelle traditionellerweise zur Analyse von prognostischen Biomarkern herangezogen werden, wird insbesondere seit dem Populärwerden von künstlichen Intelligenz-Systemen die Verwendung verschiedener Modelle des maschinellen Lernens für diesen Zweck diskutiert (Acharjee et al. 2020). In der Literatur zeigen sich verschiedene Anwendungen von solchen Modellen bei Gewebsbiomarkern (Toth et al. 2019).

Beide Modelle zeigten eine gewisse, jedoch sehr eingeschränkte Vorhersagekraft ersichtlich an einer AUC von 0,65 für die Cox-Regression und 0,66 für das *Random Forest* Modell. Dies zeigt, dass selbst in einem prognostischen Modell mit diversen Biomarkern nur ein kleiner Teil der Varianz der Überlebenswahrscheinlichkeit abgebildet werden kann. In diesen ROC-Analysen zeigen das

konventionelle Cox-Regressionsmodell und das komplexere *Random Forest* Modell eine ähnliche Vorhersagekraft. Das *Random Forest* Modell scheint hier keinen Mehrwert zu bieten. Dies ist eins von vielen Beispielen, in welchen einfache statistische Modelle genauso gut funktionieren wie Modelle, welche maschinelles Lernen verwenden.

Auffallend ist im *Random Forest* Modell eine relative Gleichgewichtung der verschiedenen Faktoren, während im Cox-Regressionmodell die Gewichtung der Parameter deutlich unterschiedlicher ausfällt. Im Cox-Regressionmodell sind die Biomarker CYFRA 21-1, IL-6, HE4, CEA und CA 19-9 am stärksten gewichtet. Vor dem Hintergrund der Resultate der anderen prognostischen Analysen in der metastasierten Studiengruppe ist die Gewichtung der Biomarker im Cox-Regressionmodell damit nachvollziehbar.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten wir in einer retrospektiven *Single-Center*-Studie an 162 Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom die prognostische Wertigkeit etablierter serologischer Biomarker bestätigen sowie neue prognostische Biomarker identifizieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ELISA-basierte Messungen von CA 19-9, CEA, CYFRA 21-1, HE4, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α , PD-1 und PD-L1 im Serum bei Patienten mit Pankreaskarzinom nach kurativ intendierter Tumoresektion, sowie bei Patienten in lokal fortgeschrittenem und metastasiertem Tumorstadium durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die retrospektive Erhebung der klinischen Daten sowie die Auswertung in Hinblick auf die prognostische Relevanz der einzelnen Biomarker in den Subgruppen und des Biomarker-Panels bei den Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom. Die intervallskalierten Serumkonzentrationen wurden in einer uni- und multivariaten Cox-Regression auf die prognostische Relevanz bezüglich des Gesamtüberlebens untersucht. Mithilfe des Youden-Index konnten neue *Cut-off*-Werte für prognostische Biomarker vorgeschlagen werden. Anhand des ermittelten *Cut-off*-Wertes wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt und Unterschiede der Überlebenskurven untersucht. Prognostische Modelle zur Vorhersage des Gesamtüberlebens anhand der Berücksichtigung aller Biomarker mit unterschiedlicher Gewichtung wurden bei den Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom erstellt.

Der beim Pankreaskarzinom am besten etablierte prognostische Biomarker CA 19-9 erlaubte bei den Patienten nach kurativer Tumoresektion anhand der Serumkonzentration von 40,0 U/ml und bei Patienten mit fernmetastasiertem Pankreaskarzinom anhand einer Serumkonzentration von 1067,0 U/ml eine Unterscheidung in Patientengruppen mit signifikant unterschiedlichem Gesamtüberleben. Zudem zeigte CA 19-9 bei den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Tumor eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben in der univariaten Cox-Regressionsanalyse. Der beim Pankreaskarzinom in der klinischen Routine ebenfalls angewandte Biomarker CEA wies in der vorliegenden Studie lediglich eine prognostische Relevanz bei den Patienten in metastasiertem Tumorstadium auf.

Übereinstimmend mit vorgängigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe war CYFRA 21-1 prognostisch relevant bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom. Erstmals zeigte sich bei Patienten nach Tumoresektion eine signifikante Korrelation zwischen den CYFRA 21-1-Serumkonzentrationen und dem Gesamtüberleben in der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse. Weiterhin erlaubte die postoperativ gemessene Serumkonzentration von CYFRA 21-1 eine Differenzierung zwischen prognostischen Gruppen anhand eines *Cut-off*-Wertes von 3,2 ng/ml. Die prognostische Wertigkeit von CYFRA 21-1 ist bei Patienten mit kurativ intendierter Pankreaskarzinomresektion unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben.

Während sich die Erkenntnisse zum prognostischen Wert von HE4 beim Pankreaskarzinom bisher auf die Proteinexpression im Tumorgewebe beschränken, zeigte diese Studie, dass Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom bei einer HE4-Serumkonzentration von > 82,2 pmol/l eine signifikant

schlechtere Überlebenskurve zeigen, verglichen mit Patienten mit niedrigerem HE4-Level. Dies stellt eine neue Erkenntnis dar, welche es in größeren prospektiven Studien zu bestätigen gilt.

Prognostisch relevant zeigte sich IL-10 bei Patienten nach Tumorresektion und bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, während im metastasiertem Tumorstadium IL-6 und IL-8 eine Einordnung in prognostische Gruppen mit signifikant differierender Überlebenskurve erlaubten.

Hingegen zeigten die löslichen Immun-Checkpoint-Marker PD-1 und PD-L1 kaum eine Assoziation mit dem Überleben der Patienten, lediglich in der metastasierten Gruppe gelang anhand eines *Cut-off*-Wertes von 0,008 ng/ml eine Unterscheidung in Patientengruppen mit unterschiedlicher Überlebenskurve.

Das Cox-Regressionsmodell mit den elf Biomarkern zeigte eine begrenzte Aussagekraft zur Vorhersage des 1-Jahres-Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinoms. Dies verdeutlicht, dass sich trotz Assoziation zwischen serologischen Biomarkern und dem Überleben die Prognose von Patienten mit Pankreaskarzinom - selbst bei Berücksichtigung diverser Biomarker – nur begrenzt anhand serologischer Biomarker vorhersagen lässt. Die Verwendung eines *Random Forest Machine learning* Modells zeigte keinen Mehrwert bezüglich der prognostischen Aussagekraft.

Das beste Diskriminationspotential zwischen den Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und den Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom wiesen CYFRA 21-1 und IL-8 auf, sodass sie in Ergänzung zu bildgebenden *Staging*-Verfahren in der klinischen Anwendung hilfreich sein könnten.

Die in dieser monozentrisch und retrospektiv durchgeführten Studie identifizierten prognostischen Biomarker sowie die vorgeschlagenen *Cut-Off*-Werte sind perspektivisch in einer multizentrischen, prospektiven Studie zu validieren.

Literaturverzeichnis

- Acharjee, A., J. Larkman, Y. Xu, V. R. Cardoso, and G. V. Gkoutos. 2020. 'A random forest based biomarker discovery and power analysis framework for diagnostics research', *BMC Med Genomics*, 13: 178.
- Andreasson, U., A. Perret-Liaudet, L. J. van Waalwijk van Doorn, K. Blennow, D. Chiasserini, S. Engelborghs, T. Fladby, S. Genc, N. Kruse, H. B. Kuiperij, L. Kulic, P. Lewczuk, B. Mollenhauer, B. Mroczko, L. Parnetti, E. Vanmechelen, M. M. Verbeek, B. Winblad, H. Zetterberg, M. Koel-Simmelink, and C. E. Teunissen. 2015. 'A Practical Guide to Immunoassay Method Validation', *Front Neurol*, 6: 179.
- Ballehaninna, U. K., and R. S. Chamberlain. 2012. 'The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal', *J Gastrointest Oncol*, 3: 105-19.
- Barreto, S. G., P. J. Shukla, and S. V. Shrikhande. 2010. 'Tumors of the Pancreatic Body and Tail', *World J Oncol*, 1: 52-65.
- Bellone, G., C. Smirne, F. A. Mauri, E. Tonel, A. Carbone, A. Buffolino, L. Dughera, A. Robecchi, M. Pirisi, and G. Emanuelli. 2006. 'Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival', *Cancer Immunol Immunother*, 55: 684-98.
- Berger, A. C., M. Garcia, Jr., J. P. Hoffman, W. F. Regine, R. A. Abrams, H. Safran, A. Konski, A. B. Benson, 3rd, J. MacDonald, and C. G. Willett. 2008. 'Postresection CA 19-9 predicts overall survival in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant chemoradiation: a prospective validation by RTOG 9704', *J Clin Oncol*, 26: 5918-22.
- Bharadwaj, U., M. Li, R. Zhang, C. Chen, and Q. Yao. 2007. 'Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation', *Cancer Res*, 67: 5479-88.
- Bian, B., D. Fanale, N. Dusetti, J. Roque, S. Pastor, A. S. Chretien, L. Incorvaia, A. Russo, D. Olive, and J. Iovanna. 2019. 'Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma', *Oncoimmunology*, 8: e1561120.
- Bingle, L., V. Singleton, and C. D. Bingle. 2002. 'The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms', *Oncogene*, 21: 2768-73.
- Boeck, S., M. Haas, R. P. Laubender, F. Kullmann, C. Klose, C. J. Bruns, R. Wilkowski, P. Stieber, S. Holdenrieder, H. Buchner, U. Mansmann, and V. Heinemann. 2010. 'Application of a time-varying covariate model to the analysis of CA 19-9 as serum biomarker in patients with advanced pancreatic cancer', *Clin Cancer Res*, 16: 986-94.
- Boeck, S., C. Wittwer, V. Heinemann, M. Haas, C. Kern, P. Stieber, D. Nagel, and S. Holdenrieder. 2013. 'Cytokeratin 19-fragments (CYFRA 21-1) as a novel serum biomarker for response and survival in patients with advanced pancreatic cancer', *Br J Cancer*, 108: 1684-94.
- Bolstad, N., M. Oijordsbakken, K. Nustad, and J. Bjerner. 2012. 'Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population', *Tumour Biol*, 33: 141-8.
- Brand, R. E., B. M. Nolen, H. J. Zeh, P. J. Allen, M. A. Eloubeidi, M. Goldberg, E. Elton, J. P. Arnoletti, J. D. Christein, S. M. Vickers, C. J. Langmead, D. P. Landsittel, D. C. Whitcomb, W. E. Grizzle, and A. E. Lokshin. 2011. 'Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer', *Clin Cancer Res*, 17: 805-16.
- Clark, C. E., S. R. Hingorani, R. Mick, C. Combs, D. A. Tuveson, and R. H. Vonderheide. 2007. 'Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion', *Cancer Res*, 67: 9518-27.
- Committee for Medical Products for Human Use (CHMP). 2011. 'Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**', European Medicines Agency. London, 2011, Accessed Jan 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.
- Conroy, T., F. Castan, A. Lopez, A. Turpin, M. Ben Abdelghani, A. C. Wei, E. Mitry, J. J. Biagi, L. Evesque, P. Artru, T. Lecomte, E. Assenat, L. Bauguion, M. Ychou, O. Bouche, L. Monard, A.

- Lambert, P. Hammel, Group Canadian Cancer Trials, and G. I. Prodigé Group the Unicancer. 2022. 'Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer: A Randomized Clinical Trial', *JAMA Oncol*, 8: 1571-78.
- Conroy, T., P. Hammel, M. Hebbar, M. Ben Abdelghani, A. C. Wei, J. L. Raoul, L. Chone, E. Francois, P. Artru, J. J. Biagi, T. Lecomte, E. Assenat, R. Faroux, M. Ychou, J. Volet, A. Sauvanet, G. Breysacher, F. Di Fiore, C. Cripps, P. Kavan, P. Texereau, K. Bouhier-Leporrier, F. Khemissa-Akouz, J. L. Legoux, B. Juzyna, S. Gourgou, C. J. O'Callaghan, C. Jouffroy-Zeller, P. Rat, D. Malka, F. Castan, J. B. Bachet, Group Canadian Cancer Trials, and G. I. Prodigé Group the Unicancer. 2018. 'FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer', *N Engl J Med*, 379: 2395-406.
- Cooper, M. J., C. R. Mackie, D. B. Skinner, and A. R. Moossa. 1979. 'A reappraisal of the value of carcinoembryonic antigen in the management of patients with various neoplasms', *Br J Surg*, 66: 120-3.
- Daamen, L. A., V. P. Groot, H. D. Heerkens, M. P. W. Intven, H. C. van Santvoort, and I. Q. Molenaar. 2018. 'Systematic review on the role of serum tumor markers in the detection of recurrent pancreatic cancer', *HPB (Oxford)*, 20: 297-304.
- Davidson-Pilon, Cameron. 2019. 'lifelines: survival analysis in Python', *Journal of Open Source Software*, 4: 1317.
- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, and J. E. de Vries. 1991. 'Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression', *J Exp Med*, 174: 915-24.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel, and J. E. de Vries. 1993. 'Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation', *J Immunol*, 150: 4754-65.
- Dembic, Zlatko. 2015. *The Cytokines of the Immune System THE ROLE OF CYTOKINES IN DISEASE RELATED TO IMMUNE RESPONSE* (Elsevier Inc, page 129).
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2021. 'Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0, 2021, AWMF Registernummer: 032-010OL', *Leitlinienprogramm Onkologie*.
- Dezutter-Dambuyant, C., I. Durand, L. Alberti, N. Bendriss-Vermare, J. Valladeau-Guilemond, A. Duc, A. Magron, A. P. Morel, V. Sisirak, C. Rodriguez, D. Cox, D. Olive, and C. Caux. 2016. 'A novel regulation of PD-1 ligands on mesenchymal stromal cells through MMP-mediated proteolytic cleavage', *Oncoimmunology*, 5: e1091146.
- Dima, S. O., C. Tanase, R. Albuлесcu, V. Herlea, M. Chivu-Economescu, R. Purnichescu-Purtan, T. Dumitrascu, D. G. Duda, and I. Popescu. 2012. 'An exploratory study of inflammatory cytokines as prognostic biomarkers in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma', *Pancreas*, 41: 1001-7.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. 'Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion', *Nat Med*, 8: 793-800.
- Drapkin, R., H. H. von Horsten, Y. Lin, S. C. Mok, C. P. Crum, W. R. Welch, and J. L. Hecht. 2005. 'Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas', *Cancer Res*, 65: 2162-9.
- Dressen, K., N. Hermann, S. Manekeller, G. Walgenbach-Bruenagel, F. A. Schildberg, K. Hettwer, S. Uhlig, J. C. Kalf, G. Hartmann, and S. Holdenrieder. 2017. 'Diagnostic Performance of a Novel Multiplex Immunoassay in Colorectal Cancer', *Anticancer Res*, 37: 2477-86.
- Ducieux, M., A. S. Cuhna, C. Caramella, A. Hollebecque, P. Burtin, D. Goere, T. Seufferlein, K. Haustermans, J. L. Van Laethem, T. Conroy, D. Arnold, and Esmo Guidelines Committee. 2015. 'Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Ann Oncol*, 26 Suppl 5: v56-68.

- Duffy, M. J., C. Sturgeon, R. Lamerz, C. Haglund, V. L. Holubec, R. Klapdor, A. Nicolini, O. Topolcan, and V. Heinemann. 2010. 'Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report', *Ann Oncol*, 21: 441-47.
- Ebrahimi, B., S. L. Tucker, D. Li, J. L. Abbruzzese, and R. Kurzrock. 2004. 'Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis', *Cancer*, 101: 2727-36.
- Edelman, M. J., L. Hodgson, P. Y. Rosenblatt, R. H. Christenson, E. E. Vokes, X. Wang, and R. Kratzke. 2012. 'CYFRA 21-1 as a prognostic and predictive marker in advanced non-small-cell lung cancer in a prospective trial: CALGB 150304', *J Thorac Oncol*, 7: 649-54.
- Escudero, J. M., J. M. Auge, X. Filella, A. Torne, J. Pahisa, and R. Molina. 2011. 'Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases', *Clin Chem*, 57: 1534-44.
- Faca, V. M., K. S. Song, H. Wang, Q. Zhang, A. L. Krasnoselsky, L. F. Newcomb, R. R. Plentz, S. Gurumurthy, M. S. Redston, S. J. Pitteri, S. R. Pereira-Faca, R. C. Ireton, H. Katayama, V. Glukhova, D. Phanstiel, D. E. Brenner, M. A. Anderson, D. Misek, N. Scholler, N. D. Urban, M. J. Barnett, C. Edelstein, G. E. Goodman, M. D. Thornquist, M. W. McIntosh, R. A. DePinho, N. Bardeesy, and S. M. Hanash. 2008. 'A mouse to human search for plasma proteome changes associated with pancreatic tumor development', *PLoS Med*, 5: e123.
- Farren, M. R., T. A. Mace, S. Geyer, S. Mikhail, C. Wu, K. Ciombor, S. Tahiri, D. Ahn, A. M. Noonan, M. Villalona-Calero, T. Bekaii-Saab, and G. B. Lesinski. 2016. 'Systemic Immune Activity Predicts Overall Survival in Treatment-Naive Patients with Metastatic Pancreatic Cancer', *Clin Cancer Res*, 22: 2565-74.
- Ferrone, C. R., D. M. Finkelstein, S. P. Thayer, A. Muzikansky, C. Fernandez-delCastillo, and A. L. Warshaw. 2006. 'Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma', *J Clin Oncol*, 24: 2897-902.
- Fincham, R. E. A., F. R. Delvecchio, M. R. Goulart, J. P. S. Yeong, and H. M. Kocher. 2021. 'Natural killer cells in pancreatic cancer stroma', *World J Gastroenterol*, 27: 3483-501.
- Finkelmeier, F., O. Canli, A. Tal, T. Pleli, J. Trojan, M. Schmidt, B. Kronenberger, S. Zeuzem, A. Piiper, F. R. Greten, and O. Waidmann. 2016. 'High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis', *Eur J Cancer*, 59: 152-59.
- Flynn, J. P., and V. Gerriets. 2022. 'Pembrolizumab.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Fusai, G., N. Warnaar, C. A. Sabin, S. Archibong, and B. R. Davidson. 2008. 'Outcome of R1 resection in patients undergoing pancreatoduodenectomy for pancreatic cancer', *Eur J Surg Oncol*, 34: 1309-15.
- Gabitass, R. F., N. E. Annels, D. D. Stocken, H. A. Pandha, and G. W. Middleton. 2011. 'Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13', *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1419-30.
- Galgano, M. T., G. M. Hampton, and H. F. Frierson, Jr. 2006. 'Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues', *Mod Pathol*, 19: 847-53.
- Gao, H. L., L. Liu, Z. H. Qi, H. X. Xu, W. Q. Wang, C. T. Wu, S. R. Zhang, J. Z. Xu, Q. X. Ni, and X. J. Yu. 2018. 'The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in pancreatic cancer: A meta-analysis', *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 17: 95-100.
- Geng, L., D. Huang, J. Liu, Y. Qian, J. Deng, D. Li, Z. Hu, J. Zhang, G. Jiang, and S. Zheng. 2008. 'B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression', *J Cancer Res Clin Oncol*, 134: 1021-7.
- Gerds, T.A., & Kattan, M.W. . 2021. 'Medical Risk Prediction: With Ties to Machine Learning (1st ed.)', *Chapman and Hall/CRC*.
- Gold, P., and S. O. Freedman. 1965. 'Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques', *J Exp Med*, 121: 439-62.
- Haas, M., V. Heinemann, F. Kullmann, R. P. Laubender, C. Klose, C. J. Bruns, S. Holdenrieder, D. P. Modest, C. Schulz, and S. Boeck. 2013. '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*, 139: 681-9.
- Haas, M., C. Kern, S. Kruger, M. Michl, D. P. Modest, C. Giessen, C. Schulz, J. C. von Einem, S. Ormanns, R. P. Laubender, S. Holdenrieder, V. Heinemann, and S. Boeck. 2015. 'Assessing novel prognostic serum biomarkers in advanced pancreatic cancer: the role of CYFRA 21-1, serum amyloid A, haptoglobin, and 25-OH vitamin D3', *Tumour Biol*, 36: 2631-40.
- Hall, M., H. Liu, M. Malafa, B. Centeno, P. J. Hodul, J. Pimiento, S. Pilon-Thomas, and A. A. Sarnaik. 2016. 'Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors', *J Immunother Cancer*, 4: 61.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hartwig, W., T. Hackert, U. Hinz, A. Gluth, F. Bergmann, O. Strobel, M. W. Buchler, and J. Werner. 2011. 'Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome', *Ann Surg*, 254: 311-9.
- Hashimoto, K., H. Ueno, M. Ikeda, Y. Kojima, A. Hagihara, S. Kondo, C. Morizane, and T. Okusaka. 2009. 'Do recurrent and metastatic pancreatic cancer patients have the same outcomes with gemcitabine treatment?', *Oncology*, 77: 217-23.
- Hassounah, N. B., V. S. Malladi, Y. Huang, S. S. Freeman, E. M. Beauchamp, S. Koyama, N. Souders, S. Martin, G. Dranoff, K. K. Wong, C. S. Pedamallu, P. S. Hammerman, and E. A. Akbay. 2019. 'Identification and characterization of an alternative cancer-derived PD-L1 splice variant', *Cancer Immunol Immunother*, 68: 407-20.
- Hata, S., Y. Sakamoto, Y. Yamamoto, S. Nara, M. Esaki, K. Shimada, and T. Kosuge. 2012. 'Prognostic impact of postoperative serum CA 19-9 levels in patients with resectable pancreatic cancer', *Ann Surg Oncol*, 19: 636-41.
- Hellstrom, I., J. Raycraft, M. Hayden-Ledbetter, J. A. Ledbetter, M. Schummer, M. McIntosh, C. Drescher, N. Urban, and K. E. Hellstrom. 2003. 'The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma', *Cancer Res*, 63: 3695-700.
- Hertlein, L., P. Stieber, A. Kirschenhofer, K. Krockner, D. Nagel, M. Lenhard, and A. Burges. 2012. 'Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases', *Clin Chem Lab Med*, 50: 2181-8.
- Hess, V., B. Glimelius, P. Grawe, D. Dietrich, G. Bodoky, T. Ruhstaller, E. Bajetta, P. Saletti, A. Figer, W. Scheithauer, and R. Herrmann. 2008. 'CA 19-9 tumour-marker response to chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer enrolled in a randomised controlled trial', *Lancet Oncol*, 9: 132-8.
- Hira-Miyazawa, M., H. Nakamura, M. Hirai, Y. Kobayashi, H. Kitahara, G. Bou-Gharios, and S. Kawashiri. 2018. 'Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage', *Int J Oncol*, 52: 379-88.
- Hirai, H. 1977. 'A collaborative clinical study of carcinoembryonic antigen in Japan', *Cancer Res*, 37: 2267-74.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. 'Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions', *Clin Cancer Res*, 12: 5423-34.
- Holcomb, K., Z. Vucetic, M. C. Miller, and R. C. Knapp. 2011. 'Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in premenopausal women', *Am J Obstet Gynecol*, 205: 358 e1-6.
- Holdenrieder, S., and P. Stieber. 2019. 'Carcinoembryonales Antigen.' in Axel M. Gressner and Torsten Arndt (eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Holdenrieder, S., B. Wehnl, K. Hettwer, K. Simon, S. Uhlig, and F. Dayyani. 2017. 'Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis', *Br J Cancer*, 116: 1037-45.

- Huang, T., S. W. Jiang, L. Qin, C. Senkowski, C. Lyle, K. Terry, S. Brower, H. Chen, W. Glasgow, Y. Wei, and J. Li. 2015. 'Expression and diagnostic value of HE4 in pancreatic adenocarcinoma', *Int J Mol Sci*, 16: 2956-70.
- IARC WHO Classification of Tumours Editorial Board (ed.)^(eds.). 2019. *WHO Classification of Tumours Digestive System Tumours 5th Edition*.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. 'Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death', *EMBO J*, 11: 3887-95.
- James, N. E., C. Chichester, and J. R. Ribeiro. 2018. 'Beyond the Biomarker: Understanding the Diverse Roles of Human Epididymis Protein 4 in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer', *Front Oncol*, 8: 124.
- James, N. E., J. B. Emerson, A. D. Borgstadt, L. Beffa, M. T. Oliver, V. Hovanesian, A. Urh, R. K. Singh, R. Rowswell-Turner, P. A. DiSilvestro, J. Ou, R. G. Moore, and J. R. Ribeiro. 2020. 'The biomarker HE4 (WFDC2) promotes a pro-angiogenic and immunosuppressive tumor microenvironment via regulation of STAT3 target genes', *Sci Rep*, 10: 8558.
- Kaltenmeier, C., I. Nassour, R. S. Hoehn, S. Khan, A. Althans, D. A. Geller, A. Paniccia, A. Zureikat, and S. Tohme. 2021. 'Impact of Resection Margin Status in Patients with Pancreatic Cancer: a National Cohort Study', *J Gastrointest Surg*, 25: 2307-16.
- Kamohara, H., M. Takahashi, T. Ishiko, M. Ogawa, and H. Baba. 2007. 'Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor', *Int J Oncol*, 31: 627-32.
- Karlsen, M. A., N. Sandhu, C. Hogdall, I. J. Christensen, L. Nedergaard, L. Lundvall, S. A. Engelholm, A. T. Pedersen, D. Hartwell, M. Lydolph, I. A. Laursen, and E. V. Hogdall. 2012. 'Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass', *Gynecol Oncol*, 127: 379-83.
- Khorana, A. A., P. B. Mangu, J. Berlin, A. Engebretson, T. S. Hong, A. Maitra, S. G. Mohile, M. Mumber, R. Schulick, M. Shapiro, S. Urba, H. J. Zeh, and M. H. Katz. 2016. 'Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline', *J Clin Oncol*, 34: 2541-56.
- Kinsella, T. J., Y. Seo, J. Willis, T. A. Stellato, C. T. Siegel, D. Harpp, J. K. Willson, J. Gibbons, J. R. Sanabria, J. M. Hardacre, and J. P. Schulak. 2008. 'The impact of resection margin status and postoperative CA19-9 levels on survival and patterns of recurrence after postoperative high-dose radiotherapy with 5-FU-based concurrent chemotherapy for resectable pancreatic cancer', *Am J Clin Oncol*, 31: 446-53.
- Kirchhoff, C., I. Habben, R. Ivell, and N. Krull. 1991. 'A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors', *Biol Reprod*, 45: 350-7.
- Klein, A. P. 2021. 'Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18: 493-502.
- Kloppel G, Solcia E, Longnecker DS, Capella C, Sobin LH. Berlin, 1996. 'Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas (2nd edn), WHO International Histological Classification of Tumours. ', *Springer-Verlag*.
- Kondo, N., Y. Murakami, K. Uemura, Y. Hayashidani, T. Sudo, Y. Hashimoto, A. Nakashima, R. Sakabe, N. Shigemoto, Y. Kato, H. Ohge, and T. Sueda. 2010. 'Prognostic impact of perioperative serum CA 19-9 levels in patients with resectable pancreatic cancer', *Ann Surg Oncol*, 17: 2321-9.
- Koprowski, H., Z. Steplewski, K. Mitchell, M. Herlyn, D. Herlyn, and P. Fuhrer. 1979. 'Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies', *Somatic Cell Genet*, 5: 957-71.
- Krueger, K., Z. Mayer, M. Gerckens, S. Boeck, P. Lupp, and S. Holdenrieder. 2022. 'High Quality Performance of Novel Immunoassays for the Sensitive Quantification of Soluble PD-1, PD-L1 and PD-L2 in Blood', *Biomedicines*, 10.
- Krueger, K., Z. Mayer, M. Kottmaier, M. Gerckens, S. Boeck, P. Lupp, and S. Holdenrieder. 2022. 'Robust Preanalytical Performance of Soluble PD-1, PD-L1 and PD-L2 Assessed by Sensitive ELISAs in Blood', *Biomedicines*, 10.

- Kruger, S., M. L. Legenstein, V. Rosgen, M. Haas, D. P. Modest, C. B. Westphalen, S. Ormanns, T. Kirchner, V. Heinemann, S. Holdenrieder, and S. 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: e1310358.
- Kruger, S., K. Schirle, M. Haas, A. Crispin, J. Schirra, J. Mayerle, J. G. D'Haese, W. G. Kunz, J. Ricke, S. Ormanns, T. Kirchner, S. Kobold, M. Ilmer, L. Gebauer, C. B. Westphalen, M. von Bergwelt-Baildon, J. Werner, V. Heinemann, and S. Boeck. 2020. 'Prolonged time to treatment initiation in advanced pancreatic cancer patients has no major effect on treatment outcome: a retrospective cohort study controlled for lead time bias and waiting time paradox', *J Cancer Res Clin Oncol*, 146: 391-99.
- Kuipers, H., F. Muskens, M. Willart, D. Hijdra, F. B. van Assema, A. J. Coyle, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2006. 'Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation', *Eur J Immunol*, 36: 2472-82.
- Kunzmann, V., J. T. Siveke, H. Algul, E. Goekkurt, G. Siegler, U. Martens, D. Waldschmidt, U. Pelzer, M. Fuchs, F. Kullmann, S. Boeck, T. J. Ettrich, S. Held, R. Keller, I. Klein, C. T. Germer, H. Stein, H. Friess, M. Bahra, R. Jakobs, I. Hartlapp, V. Heinemann, Group German Pancreatic Cancer Working, and Neolap investigators. 2021. 'Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus nab-paclitaxel plus gemcitabine followed by FOLFIRINOX induction chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer (NEOLAP-AIO-PAK-0113): a multicentre, randomised, phase 2 trial', *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 6: 128-38.
- Lange, F., K. Rateitschak, B. Fitzner, R. Pohland, O. Wolkenhauer, and R. Jaster. 2011. 'Studies on mechanisms of interferon-gamma action in pancreatic cancer using a data-driven and model-based approach', *Mol Cancer*, 10: 13.
- Li, M., Y. Zhang, L. W. Feurino, H. Wang, W. E. Fisher, F. C. Brunicardi, C. Chen, and Q. Yao. 2008. 'Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer', *Cancer Sci*, 99: 733-7.
- Loizides, F., B. Schmidt, Thomas Kluyver, Benjamin Ragan-Kelley, Fernando Pérez, Brian Granger, Matthias Bussonnier, Jonathan Frederic, Kyle Kelley, Jessica Hamrick, Jason Grout, Sylvain Corlay, Paul Ivanov, Damián Avila, Safia Abdalla, and Carol Willing. 2016. "Jupyter Notebooks - a publishing format for reproducible computational workflows." In, edited by F. Loizides, B. Schmidt, Thomas Kluyver, Benjamin Ragan-Kelley, Fernando Pérez, Brian Granger, Matthias Bussonnier, Jonathan Frederic, Kyle Kelley, Jessica Hamrick, Jason Grout, Sylvain Corlay, Paul Ivanov, Damián Avila, Safia Abdalla and Carol Willing, 87 - 90.
- Louvet, C., R. Labianca, P. Hammel, G. Lledo, M. G. Zampino, T. Andre, A. Zaniboni, M. Ducreux, E. Aitini, J. Taieb, R. Faroux, C. Lepere, A. de Gramont, Gercor, and Giscad. 2005. 'Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial', *J Clin Oncol*, 23: 3509-16.
- Luttges, J., S. Schemm, I. Vogel, J. Hedderich, B. Kremer, and G. Kloppel. 2000. 'The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation', *J Pathol*, 191: 154-61.
- Maisey, N. R., A. R. Norman, A. Hill, A. Massey, J. Oates, and D. Cunningham. 2005. 'CA19-9 as a prognostic factor in inoperable pancreatic cancer: the implication for clinical trials', *Br J Cancer*, 93: 740-3.
- Marshall, J. S., I. Leal-Berumen, L. Nielsen, M. Glibetic, and M. Jordana. 1996. 'Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells', *J Clin Invest*, 97: 1122-8.
- Matsuo, Y., H. Sawai, H. Funahashi, H. Takahashi, M. Sakamoto, M. Yamamoto, Y. Okada, T. Hayakawa, and T. Manabe. 2004. 'Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential', *Pancreas*, 28: 344-52.
- Meng, Q., S. Shi, C. Liang, D. Liang, W. Xu, S. Ji, B. Zhang, Q. Ni, J. Xu, and X. Yu. 2017. 'Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis', *Onco Targets Ther*, 10: 4591-98.
- Mitsunaga, S., M. Ikeda, S. Shimizu, I. Ohno, J. Furuse, M. Inagaki, S. Higashi, H. Kato, K. Terao, and A. Ochiai. 2013. 'Serum levels of IL-6 and IL-1beta can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer', *Br J Cancer*, 108: 2063-9.

- Moore, R. G., A. K. Brown, M. C. Miller, S. Skates, W. J. Allard, T. Verch, M. Steinhoff, G. Messerlian, P. DiSilvestro, C. O. Granai, and R. C. Bast, Jr. 2008. 'The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass', *Gynecol Oncol*, 108: 402-8.
- Moore, R. G., M. C. Miller, M. M. Steinhoff, S. J. Skates, K. H. Lu, G. Lambert-Messerlian, and R. C. Bast, Jr. 2012. 'Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders', *Am J Obstet Gynecol*, 206: 351 e1-8.
- Mumm, J. B., J. Emmerich, X. Zhang, I. Chan, L. Wu, S. Mauze, S. Blaisdell, B. Basham, J. Dai, J. Grein, C. Sheppard, K. Hong, C. Cutler, S. Turner, D. LaFace, M. Kleinschek, M. Judo, G. Ayanoglu, J. Langowski, D. Gu, B. Paporello, E. Murphy, V. Sriram, S. Naravula, B. Desai, S. Medicherla, W. Seghezzi, T. McClanahan, S. Cannon-Carlson, A. M. Beebe, and M. Oft. 2011. 'IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance', *Cancer Cell*, 20: 781-96.
- Naing, A., J. R. Infante, K. P. Papadopoulos, I. H. Chan, C. Shen, N. P. Ratti, B. Rojo, K. A. Autio, D. J. Wong, M. R. Patel, P. A. Ott, G. S. Falchook, S. Pant, A. Hung, K. L. Pekarek, V. Wu, M. Adamow, S. McCauley, J. B. Mumm, P. Wong, P. Van Vlasselaer, J. Leveque, N. M. Tannir, and M. Oft. 2018. 'PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8(+) T Cell Infiltration and Polyclonal T Cell Expansion in Cancer Patients', *Cancer Cell*, 34: 775-91 e3.
- Neal, R. D., P. Tharmanathan, B. France, N. U. Din, S. Cotton, J. Fallon-Ferguson, W. Hamilton, A. Hendry, M. Hendry, R. Lewis, U. Macleod, E. D. Mitchell, M. Pickett, T. Rai, K. Shaw, N. Stuart, M. L. Topping, C. Wilkinson, B. Williams, N. Williams, and J. Emery. 2015. 'Is increased time to diagnosis and treatment in symptomatic cancer associated with poorer outcomes? Systematic review', *Br J Cancer*, 112 Suppl 1: S92-107.
- Neoptolemos, J. P., D. H. Palmer, P. Ghaneh, E. E. Psarelli, J. W. Valle, C. M. Halloran, O. Faluyi, D. A. O'Reilly, D. Cunningham, J. Wadsley, S. Darby, T. Meyer, R. Gillmore, A. Anthoney, P. Lind, B. Glimelius, S. Falk, J. R. Izbicki, G. W. Middleton, S. Cummins, P. J. Ross, H. Wasan, A. McDonald, T. Crosby, Y. T. Ma, K. Patel, D. Sherriff, R. Soomal, D. Borg, S. Sothi, P. Hammel, T. Hackert, R. Jackson, M. W. Buchler, and Cancer European Study Group for Pancreatic. 2017. 'Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial', *Lancet*, 389: 1011-24.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R. Padbury, M. J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M. N. Wenthe, J. R. Izbicki, H. Friess, M. M. Lerch, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, R. Doi, P. A. Lind, D. Smith, J. W. Valle, D. H. Palmer, J. A. Buckels, J. Thompson, C. J. McKay, C. L. Rawcliffe, M. W. Buchler, and Cancer European Study Group for Pancreatic. 2010. 'Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial', *JAMA*, 304: 1073-81.
- Nielsen, C., L. Ohm-Laursen, T. Barington, S. Husby, and S. T. Lillevang. 2005. 'Alternative splice variants of the human PD-1 gene', *Cell Immunol*, 235: 109-16.
- Nomi, T., M. Sho, T. Akahori, K. Hamada, A. Kubo, H. Kanehiro, S. Nakamura, K. Enomoto, H. Yagita, M. Azuma, and Y. Nakajima. 2007. 'Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer', *Clin Cancer Res*, 13: 2151-7.
- O'Neal, R. L., K. T. Nam, B. J. LaFleur, B. Barlow, K. Nozaki, H. J. Lee, W. H. Kim, H. K. Yang, C. Shi, A. Maitra, E. Montgomery, M. K. Washington, W. El Rifai, R. I. Drapkin, and J. R. Goldenring. 2013. 'Human epididymis protein 4 is up-regulated in gastric and pancreatic adenocarcinomas', *Hum Pathol*, 44: 734-42.
- Oettle, H., S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W. O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken, and H. Riess. 2007. 'Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial', *JAMA*, 297: 267-77.
- Ohkuma, R., E. Yada, S. Ishikawa, D. Komura, Y. Kubota, K. Hamada, A. Horiike, T. Ishiguro, Y. Hirasawa, H. Ariizumi, M. Shida, M. Watanabe, R. Onoue, K. Ando, J. Tsurutani, K. Yoshimura, T. Sasada, T. Aoki, M. Murakami, T. Norose, N. Ohike, M. Takimoto, S. Kobayashi, T. Tsunoda, and S. Wada. 2021. 'High levels of human epididymis protein 4 mRNA and protein expression are associated with chemoresistance and a poor prognosis in pancreatic cancer', *Int J Oncol*, 58: 57-69.

- Okamura, A., H. Takeuchi, S. Matsuda, M. Ogura, T. Miyasho, R. Nakamura, T. Takahashi, N. Wada, H. Kawakubo, Y. Saikawa, and Y. Kitagawa. 2015. 'Factors affecting cytokine change after esophagectomy for esophageal cancer', *Ann Surg Oncol*, 22: 3130-5.
- Oken, M. M., R. H. Creech, D. C. Tormey, J. Horton, T. E. Davis, E. T. McFadden, and P. P. Carbone. 1982. 'Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group', *Am J Clin Oncol*, 5: 649-55.
- Okuma, Y., Y. Hosomi, Y. Nakahara, K. Watanabe, Y. Sagawa, and S. Homma. 2017. 'High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer', *Lung Cancer*, 104: 1-6.
- Omary, M. B., N. O. Ku, P. Strnad, and S. Hanada. 2009. 'Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease', *J Clin Invest*, 119: 1794-805.
- Park, I. J., G. S. Choi, K. H. Lim, B. M. Kang, and S. H. Jun. 2009. 'Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical significance of the preoperative level', *Ann Surg Oncol*, 16: 3087-93.
- Pedregosa, F., G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, and E. Duchesnay. 2011. 'Scikit-learn: Machine Learning in Python', *Journal of Machine Learning Research*, 12: 2825–30.
- Peixoto, R. D., C. Speers, C. E. McGahan, D. J. Renouf, D. F. Schaeffer, and H. F. Kennecke. 2015. 'Prognostic factors and sites of metastasis in unresectable locally advanced pancreatic cancer', *Cancer Med*, 4: 1171-7.
- Piro, G., F. Simionato, C. Carbone, M. Frizziero, G. Malleo, S. Zanini, R. Casolino, R. Santoro, M. M. Mina, C. Zecchetto, V. Merz, A. Scarpa, C. Bassi, G. Tortora, and D. Melisi. 2017. 'A circulating TH2 cytokines profile predicts survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma', *Oncoimmunology*, 6: e1322242.
- Rea, I. M., D. S. Gibson, V. McGilligan, S. E. McNerlan, H. D. Alexander, and O. A. Ross. 2018. 'Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines', *Front Immunol*, 9: 586.
- Rettig, T. C., L. Verwijmeren, I. M. Dijkstra, D. Boerma, E. M. van de Garde, and P. G. Noordzij. 2016. 'Postoperative Interleukin-6 Level and Early Detection of Complications After Elective Major Abdominal Surgery', *Ann Surg*, 263: 1207-12.
- Rincon, M. 2012. 'Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases', *Trends Immunol*, 33: 571-7.
- Roach, D. R., A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2002. 'TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection', *J Immunol*, 168: 4620-7.
- Robert Koch-Institut. 2021. "Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021." In.
- Robin, Xavier, Natacha Turck, Alexandre Hainard, Natalia Tiberti, Frédérique Lisacek, Jean-Charles Sanchez, and Markus Müller. 2011. 'pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves', *BMC Bioinformatics*, 12: 77.
- Roshani, R., F. McCarthy, and T. Hagemann. 2014. 'Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer', *Cancer Lett*, 345: 157-63.
- Sato, T., M. Terai, Y. Tamura, V. Alexeev, M. J. Mastrangelo, and S. R. Selvan. 2011. 'Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy', *Immunol Res*, 51: 170-82.
- Savid-Frontera, C., M. E. Viano, N. S. Baez, N. L. Lidon, Q. Fontaine, H. A. Young, L. Vimeux, E. Donnadieu, and M. C. Rodriguez-Galan. 2022. 'Exploring the immunomodulatory role of virtual memory CD8(+) T cells: Role of IFN gamma in tumor growth control', *Front Immunol*, 13: 971001.
- Schildberg, F. A., S. R. Klein, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2016. 'Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family', *Immunity*, 44: 955-72.

- Schmidt, C. M., J. M. Matos, D. J. Bentrem, M. S. Talamonti, K. D. Lillemoe, and K. Y. Bilimoria. 2008. 'Acinar cell carcinoma of the pancreas in the United States: prognostic factors and comparison to ductal adenocarcinoma', *J Gastrointest Surg*, 12: 2078-86.
- Schmieder, A., J. Michel, K. Schonhaar, S. Goerdts, and K. Schledzewski. 2012. 'Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages', *Semin Cancer Biol*, 22: 289-97.
- Schooltink, H., and St Rose-John. 2003. 'Das Zytokinnetzwerk', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 46: 188-96.
- Schummer, M., W. V. Ng, R. E. Bumgarner, P. S. Nelson, B. Schummer, D. W. Bednarski, L. Hassell, R. L. Baldwin, B. Y. Karlan, and L. Hood. 1999. 'Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas', *Gene*, 238: 375-85.
- Sclabas, G. M., S. Fujioka, C. Schmidt, Z. Li, W. A. Frederick, W. Yang, K. Yokoi, D. B. Evans, J. L. Abbruzzese, K. R. Hess, W. Zhang, I. J. Fidler, and P. J. Chiao. 2005. 'Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells', *Clin Cancer Res*, 11: 440-9.
- Seufferlein, T., M. Porzner, T. Becker, V. Budach, G. Ceyhan, I. Esposito, R. Fietkau, M. Follmann, H. Friess, P. Galle, M. Geissler, M. Glanemann, T. Gress, V. Heinemann, W. Hohenberger, U. Hopt, J. Izbicki, E. Klar, J. Kleeff, I. Kopp, F. Kullmann, T. Langer, J. Langrehr, M. Lerch, M. Lohr, J. Luttges, M. Lutz, J. Mayerle, P. Michl, P. Moller, M. Molls, M. Munter, M. Nothacker, H. Oettle, S. Post, A. Reinacher-Schick, C. Rocken, E. Roeb, H. Saeger, R. Schmid, W. Schmiegel, M. Schoenberg, J. Siveke, M. Stuschke, A. Tannapfel, W. Uhl, S. Unverzagt, B. van Oorschot, Y. Vashist, J. Werner, E. Yekebas, AWMF Guidelines Programme Oncology, V. German Cancer Society e, and Aid German Cancer. 2013. '[S3-guideline exocrine pancreatic cancer]', *Z Gastroenterol*, 51: 1395-440.
- Sideras, K., H. Braat, J. Kwekkeboom, C. H. van Eijck, M. P. Peppelenbosch, S. Sleijfer, and M. Bruno. 2014. 'Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies', *Cancer Treat Rev*, 40: 513-22.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal. 2021. 'Cancer Statistics, 2021', *CA Cancer J Clin*, 71: 7-33.
- Siveen, K. S., and G. Kuttan. 2009. 'Role of macrophages in tumour progression', *Immunol Lett*, 123: 97-102.
- Sobin L.H., Gaspodarowicz M.K., Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumors. 7th ed. Wiley & Sons; New York, NY, USA. 2009. *TNM Classification of Malignant Tumors. 7th ed. Wiley & Sons; New York, NY, USA.*
- Sohal, D. P. S., E. B. Kennedy, A. Khorana, M. S. Copur, C. H. Crane, I. Garrido-Laguna, S. Krishnamurthi, C. Moravek, E. M. O'Reilly, P. A. Philip, R. K. Ramanathan, J. T. Ruggiero, M. A. Shah, S. Urba, H. E. Uronis, M. W. Lau, and D. Laheru. 2018. 'Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update', *J Clin Oncol*, 36: 2545-56.
- Stieber, P., U. Hasholzner, H. Bodenmuller, D. Nagel, L. Sunder-Plassmann, H. Dienemann, W. Meier, and A. Fateh-Moghadam. 1993. 'CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer', *Cancer*, 72: 707-13.
- Suker, M., B. R. Beumer, E. Sadot, L. Marthey, J. E. Faris, E. A. Mellon, B. F. El-Rayes, A. Wang-Gillam, J. Lacy, P. J. Hosein, S. Y. Moorcraft, T. Conroy, F. Hohla, P. Allen, J. Taieb, T. S. Hong, R. Shridhar, I. Chau, C. H. van Eijck, and B. G. Koerkamp. 2016. 'FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis', *Lancet Oncol*, 17: 801-10.
- Takahashi, N., S. Iwasa, Y. Sasaki, H. Shoji, Y. Honma, A. Takashima, N. T. Okita, K. Kato, T. Hamaguchi, and Y. Yamada. 2016. '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*, 142: 1727-38.
- Team, R Studio. 2020. "RStudio: Integrated Development Environment for R." In. Boston, MA.
- Tempero, M. A., M. P. Malafa, M. Al-Hawary, H. Asbun, A. Bain, S. W. Behrman, A. B. Benson, 3rd, E. Binder, D. B. Cardin, C. Cha, E. G. Chiorean, V. Chung, B. Czito, M. Dillhoff, E. Dotan, C. R. Ferrone, J. Hardacre, W. G. Hawkins, J. Herman, A. H. Ko, S. Komanduri, A. Koong, N. LoConte, A. M. Lowy, C. Moravek, E. K. Nakakura, E. M. O'Reilly, J. Obando, S. Reddy, C. Scaife, S. Thayer, C. D. Weekes, R. A. Wolff, B. M. Wolpin, J. Burns, and S. Darlow. 2017. 'Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology', *J Natl Compr Canc Netw*, 15: 1028-61.

- Tempero, M. A., E. Uchida, H. Takasaki, D. A. Burnett, Z. Steplewski, and P. M. Pour. 1987. 'Relationship of carbohydrate antigen 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer', *Cancer Res*, 47: 5501-3.
- Therneau, Terry M. 2021. "A Package for Survival Analysis in R." In.
- Thirunavukarasu, P., S. Sukumar, M. Sathaiyah, M. Mahan, K. D. Pragatheeshwar, J. F. Pingpank, H. Zeh, 3rd, C. J. Bartels, K. K. Lee, and D. L. Bartlett. 2011. 'C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management', *J Natl Cancer Inst*, 103: 689-97.
- Thompson-Snipes, L., V. Dhar, M. W. Bond, T. R. Mosmann, K. W. Moore, and D. M. Rennick. 1991. 'Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors', *J Exp Med*, 173: 507-10.
- Toth, R., H. Schiffmann, C. Hube-Magg, F. Buscheck, D. Hoflmayer, S. Weidemann, P. Lebok, C. Fraune, S. Minner, T. Schlomm, G. Sauter, C. Plass, Y. Assenov, R. Simon, J. Meiners, and C. Gerhauser. 2019. 'Random forest-based modelling to detect biomarkers for prostate cancer progression', *Clin Epigenetics*, 11: 148.
- Tsen, A., M. Barbara, and L. Rosenkranz. 2018. 'Dilemma of elevated CA 19-9 in biliary pathology', *Pancreatology*, 18: 862-67.
- Ueno, H., T. Kosuge, Y. Matsuyama, J. Yamamoto, A. Nakao, S. Egawa, R. Doi, M. Monden, T. Hatori, M. Tanaka, M. Shimada, and K. Kanemitsu. 2009. 'A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer', *Br J Cancer*, 101: 908-15.
- Valle, J. W., D. Palmer, R. Jackson, T. Cox, J. P. Neoptolemos, P. Ghaneh, C. L. Rawcliffe, C. Bassi, D. D. Stocken, D. Cunningham, D. O'Reilly, D. Goldstein, B. A. Robinson, C. Karapetis, A. Scarfe, F. Lacaine, J. Sand, J. R. Izbic, J. Mayerle, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, P. A. Lind, M. R. Middleton, A. Anthoney, K. Sumpter, R. Carter, and M. W. Buchler. 2014. 'Optimal duration and timing of adjuvant chemotherapy after definitive surgery for ductal adenocarcinoma of the pancreas: ongoing lessons from the ESPAC-3 study', *J Clin Oncol*, 32: 504-12.
- van Duijneveldt, G., M. D. W. Griffin, and T. L. Putoczki. 2020. 'Emerging roles for the IL-6 family of cytokines in pancreatic cancer', *Clin Sci (Lond)*, 134: 2091-115.
- van Rossum, Guido, and Fred L. Drake. 2009. *Python 3 Reference Manual* (CreateSpace: Scotts Valley, CA).
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, and M. F. Renschler. 2013. 'Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine', *N Engl J Med*, 369: 1691-703.
- Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess, and M. W. Buchler. 2004. 'Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma', *Br J Surg*, 91: 586-94.
- Wan, B., H. Nie, A. Liu, G. Feng, D. He, R. Xu, Q. Zhang, C. Dong, and J. Z. Zhang. 2006. 'Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis', *J Immunol*, 177: 8844-50.
- Wasif, N., C. Y. Ko, J. Farrell, Z. Wainberg, O. J. Hines, H. Reber, and J. S. Tomlinson. 2010. 'Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging?', *Ann Surg Oncol*, 17: 2312-20.
- Waugh, D. J., and C. Wilson. 2008. 'The interleukin-8 pathway in cancer', *Clin Cancer Res*, 14: 6735-41.
- Winter, J. M., C. J. Yeo, and J. R. Brody. 2013. 'Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer', *J Surg Oncol*, 107: 15-22.
- Xie, K. 2001. 'Interleukin-8 and human cancer biology', *Cytokine Growth Factor Rev*, 12: 375-91.
- Youden, W. J. 1950. 'Index for rating diagnostic tests', *Cancer*, 3: 32-5.

Zhang, M., G. Ding, L. Zhou, T. Shen, X. Xu, T. Zhao, S. Jia, and L. Cao. 2018. 'Interferon Gamma Inhibits CXCL8-Induced Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer BxPC-3 Cell Line via a RhoGDI2/Rac1/NF-kappaB Signaling Pathway', *J Interferon Cytokine Res*, 38: 413-22.

Zhao, F., S. Obermann, R. von Wasielewski, L. Haile, M. P. Manns, F. Korangy, and T. F. Greten. 2009. 'Increase in frequency of myeloid-derived suppressor cells in mice with spontaneous pancreatic carcinoma', *Immunology*, 128: 141-9.

Zou, W. 2005. 'Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance', *Nat Rev Cancer*, 5: 263-74.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Böck für die Überlassung des Themas und die Begleitung durch den Promotionsprozess.

Herrn PD Dr. Stefan Kruger und Frau Dr. Klara Dorman danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Studienzentrale AG Onkologie des Klinikums der Universität München möchte ich herzlich danken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmern bedanken, die durch Ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie diese erst ermöglicht haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holdenrieder für die Möglichkeit, die serologischen Messungen in seinem Forschungslabor durchführen zu dürfen und für die verlässliche Unterstützung, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Auch Kimberly Krüger und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriumsmedizin im Deutschen Herzzentrum München möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klawonn, Leiter der Projektgruppe „Biostatistik“ des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig und Direktor des Instituts für Angewandte Informatik der Ostfalia Hochschule für angewandte Wissenschaften, für den intensiven Austausch und die professionelle Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Zutiefst dankbar bin ich meiner Familie für ihre stetige Ermutigung und Begleitung auf meinem Weg.

Eidesstattliche Erklärung

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

Prognostischer Wert serologischer Biomarker bei Patienten mit 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.

München, den 10.05.2024

Miriam Gerckens