

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,  
Rheumatologie)

**Thrombozytäre PD-L1 Expression als Biomarker in  
Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Strähle, Jasmin**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp  
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Toulany  
  
Tag der Disputation: 13.12.2019

# Inhalt

Aus der Medizinischen Klinik Tübingen.....	0
Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	6
1. Einleitung.....	9
1.1. Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC).....	9
1.2. Thrombozyten .....	11
1.3. Die Immuncheckpointproteine PD-1 und PD-L1.....	13
1.3.1. Programmed cell death 1 (PD-1) .....	14
1.3.2. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1, B7-H1, CD 274).....	15
1.3.3. PD-1/PD-L1 Interaktion.....	16
1.4. Immuncheckpointinhibitoren.....	18
1.4.1. anti-PD-1 Therapie .....	19
1.4.2. anti-PD-L1 .....	21
2. Zentrale Fragestellung.....	22
3. Material und Methoden .....	23
3.2. Patientenrekrutierung.....	25
3.3. Isolation von plättchenreichem Plasma .....	26
3.4. Durchflusszytometrische Analyse .....	26
3.4.1. Aufbereitung der Patientenproben für die Durchflusszytometrie... ..	28
3.4.2. Gatingstrategie .....	31
3.5. PCR.....	33
3.5.1. mRNA-Isolation aus Thrombozyten .....	34
3.5.2. Umschreibung in cDNA .....	35
3.5.3. Quantitative RT-PCR .....	35
3.6. Auswertung und Statistik.....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1. Patientenkollektiv .....	38
4.2. Detektion von thrombozytärem PD-L1 .....	40
4.2.1. Untersuchung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten.....	40
4.2.2. Thrombozytäres PD-L1 auf unstimulierten Thrombozyten.....	42

4.2.3. PD-L1 Expression auf stimulierten Thrombozyten .....	43
4.3. PD-L1 Langzeitverlauf .....	45
4.4. Korrelationen mit erhobenen Parametern .....	49
4.4.1. Korrelation mit Geschlecht, Histologie und UICC Stadium .....	49
4.4.2. Therapievergleich: keine Immuntherapie vs. Immuntherapie .....	54
4.4.3. Vergleich thrombozytäres PD-L1 mit Laborparametern .....	57
4.5. PD-L1-Tumoranalyse im Vergleich zu thrombozytärem PD-L1 .....	64
4.6. PD-L1 mRNA in Thrombozyten .....	65
4.7. Überlebensanalysen des Gesamtkollektivs .....	68
4.8. Überlebensanalysen bei Patienten unter Immuncheckpointinhibitoren	74
5. Diskussion .....	77
5.1. Diskussion der Methodik .....	77
5.2. Patientenkollektiv .....	78
5.3. Detektion von thrombozytärem PD-L1 .....	79
5.4. Korrelationen mit erhobenen Parametern .....	83
5.5. Herkunft des thrombozytären PD-L1 .....	89
5.6. Überlebensanalyse .....	92
5.7. Ausblick .....	96
6. Zusammenfassung .....	97
References .....	100
Anhang: .....	112
Erklärung zum Eigenanteil .....	116
Danksagung .....	117

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cancer-immunity-circle. Modifiziert nach [42]	14
Abbildung 2: Signalweg einer PD-L1/PD-1 Interaktion (modifiziert nach [89])	18
Abbildung 3: Funktionsschemata der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [118]).	27
Abbildung 4: Histogrammdarstellung der gemessenen PD-L1 Expression (hier in APC); in blau dargestellt die Fluoreszenz-minus-one Probe und in rot der Versuchsansatz	30
Abbildung 5: Mittels FSC/SSC- Streuungsdiagramms wird auf die Thrombozyten gated. Dann wird diese Population (G1-lebende Thrombozyten), auf Expression von CD41a untersucht, um zeigen zu können, dass sie das thrombozytenspezifische CD41a exprimiert und somit nur Thrombozyten enthält. Dann wird Population G1 auf den Aktivierungsmarker CD62P (Gate: CD62P-FITC) untersucht.	32
Abbildung 6: Mittels dem Versuchsansatz Fluoreszenz-minus-one konnte das Gate für das zu untersuchende Protein PD-L1 oder CD274 in der Farbe APC gelegt werden. Und mit dem anti-human gerichteten Antikörper konnte eine Detektion von 6,1 % CD274-positiver Zellen detektiert werden.	33
Abbildung 7: Darstellung der Amplifikationskurven der PCR in der Light Cycler Software 480	37
Abbildung 8: Dargestellt ist die CD62P- Expression der Thrombozyten von NSCLC-Patienten und Kontrollprobanden vor und nach Stimulation mittels TRAP-6 (Vorzeichentest für verbundene Stichproben $p < 0,001$ ). Dargestellt sind 95 CI des Medians.	41
Abbildung 9: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Tumorpatienten mit NSCLC im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten ohne Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP-6 (t-Test $p < 0,001$ )	43
Abbildung 10: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression vor und nach Stimulation mittels TRAP-6 (t-test $p < 0,001$ ).	44
Abbildung 11: Thrombozytäre PD-L1 Expression der Kontrollprobanden im Vergleich zu der thrombozytären PD-L1 Expression der Patienten mit NSCLC nach Stimulation mittels TRAP-6 (t-test $p < 0,001$ ).	45
Abbildung 12 Thrombozytäre PD-L1 Expression im Verlauf unter Carboplatin/Pemetrexed-Therapie. Dargestellt sind sowohl die thrombozytäre PD-L1 Expression mit und ohne TRAP-6 Stimulation. Zusätzlich sind die computertomografischen Befunde dargestellt.	47
Abbildung 13: Beobachtung der thrombozytären PD-L1 Expression vor und unter anti-PD-1 (Pembrolizumab)- Therapie im Vergleich sind CT-Bilder aus den jeweiligen Untersuchungen dargestellt.	48
Abbildung 14: Thrombozytäres PD-L1 im Vergleich der beiden Geschlechtern (t-test $p = 0,48$ )	49
Abbildung 15: Vergleich der Altersstufen untereinander (ANOVA $p = 0,953$ ). Im Vergleich der unterschiedlichen Altersstufen konnte keine Korrelation der PD-L1	

Expression auf Thrombozyten detektiert werden (ANOVA, $p=0,953$ , logarithmiert).	50
Abbildung 16: Vergleich des thrombozytären PD-L1 Expression der beiden Histologischen Subtypen ( t-Test: $p= 0,491$ )	51
Abbildung 17: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression bezugnehmend auf die Raucheranamnese ( $p=0,79$ )	52
Abbildung 18: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression der UICC-Stadien (t-Test $p=0,7$ )	53
Abbildung 19: Vergleich der PD-L1 Expressionen in den unterschiedenen Therapiezyklen (ANOVA $p=0,127$ )	54
Abbildung 20: Vergleich der verschiedenen Therapieregimen der Untergruppen „keine Immuntherapie“, anti-PD-1-Therapie, der anti-PD-L1- Therapie, im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten (ANOVA, Tukey-Test: kein Checkpointinhibitor vs. Kontrollen $p<0,001$ , anti-PD-1-Antikörper vs. Kontrollen $p<0,001$ , kein Checkpointinhibitor vs. anti-PD-1: $p=0,045$ , anti-PD-L1-Antikörper vs. kein Checkpointinhibitor $p<0,001$ ; anti-PD-1-Antikörper vs. anti-PD-1-Antikörper $p<0,001$ ; anti-PD-L1-Antikörper vs. Kontrollprobanden $p<0,001$ )	56
Abbildung 21: Korrelation des thrombozytären PD-L1 mit CRP in mg/dl (Spearman-Rho $p=0,146$ )	58
Abbildung 22: Korrelation der Leukozytenzahl mit thrombozytärem PD-L1 (Spearman-Rho $p=0,069$ )	59
Abbildung 23: Korrelation der Lymphozytenzahl mit der thrombozytären PD-L1 Expression (Spearman-Rho $p=0,588$ )	60
Abbildung 24: Korrelation der Laktatdehydrogenase mit thrombozytärem PD-L1 (Spearman-Rho: $p=0,017$ ; Korrelationskoeffizient 0,23)	61
Abbildung 25: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression bezugnehmend auf die Einnahme von Thrombozyteninhibitoren ( $p=0,638$ )	62
Abbildung 26: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression bezugnehmend auf den KRAS-Mutationsstatus (t-test: $p=0,456$ )	63
Abbildung 27: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression in Bezug auf den EGFR-Mutationsstatus (t-test $p=0,446$ )	63
Abbildung 28: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression mit der Immunhistologisch bestimmten PD-L1 Expression einer Biopsie des Primärtumors	65
Abbildung 29: Vergleich der thrombozytären PD-L1 mRNA in Tumorpatienten und Kontrollpatienten	66
Abbildung 30: Korrelation der mRNA Expression von PD-L1 mit der PD-L1 Proteinexpression der durchflusszytometrischen Analyse ( $p<0,01$ nach Spearman; Korrelationskoeffizient 0,747)	67
Abbildung 31: Vergleich des PFS unter 3 Monate und über 3 Monate (t-Test $p=0,007$ )	68
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve der 4 Subgruppen: „sehr wenig PD-L1“, „wenig PD-L1“, „viel PD-L1“ und „sehr viel PD-L1“. Im Vergleich zu allen anderen Subgruppen zeigen Patienten mit sehr viel PD-L1 ein signifikant	

schlechteres Überleben ((Log-Rank/Wilcoxon-Rank-Test) Gruppe 1 vs. Gruppe 4 p=0,022; Gruppe 2 vs. Gruppe 4 p=0,034, Gruppe 3 vs. Gruppe 4 p=0,005). 71	
Abbildung 33: Progressionsfreies Überleben der Patienten in Bezugnahme auf deren thrombozytäre PD-L1 Expression (Log Rank 1 vs 4 p=0,042; 2 vs.4 p=0,07; 3 vs. 4 p=0,039)	73
Abbildung 34: Progressionsfreies Überleben der Patienten unter anti-PD-1 Antikörper im Vergleich (2 vs. 4 p=0,863, 1 vs. 4 p= 0,969; 3 vs. 4 p= 0,064; 2 vs. 3: p=0,057; 1 vs. 3 p=0,107; 1 vs. 2 p=0,647)	75
Abbildung 35: Gesamtüberleben der Patienten unter anti-PD-1 Therapie im Vergleich bezugnehmend auf deren thrombozytären PD-L1 Status (LogRank: 2 vs. 4 p=0,909; 1 vs. 4 p= 0,914; 3 vs. 4 p=0,953; 2 vs. 3 p=0,931; 1 vs. 3 p=0,924; 1 vs. 2 p= 0,857).	76
Anhang-Abbildung 1: Übersichtlichere Darstellung des OS der Gesamtpopulation (Log Rank p=0,001)	112
Anhang-Abbildung 2: Übersichtlichere Darstellung des PFS der Gesamtpopulation (Log-Rank p=0,008)	113

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Staging des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach UICC 8 [10] (modifiziert).....	10
Tabelle 2: verwendete Antikörper.....	23
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial.....	24
Tabelle 4: verwendete Kits und Primer.....	24
Tabelle 5: verwendete Geräte .....	25
Tabelle 6: verwendete Programme .....	25
Tabelle 7: Antikörperpanel der 3 Versuchsansätze mit verwendeter Zellzahl und Volumen .....	29
Tabelle 8: Kontrollprobandencharakteristika .....	38
Tabelle 9: Patientencharakteristika der NSCLC-Patienten.....	39
Tabelle 10: Perzentilenberechnung und Gruppeneinteilung nach den Perzentilen .....	69
Tabelle 11: Vergleich der 4 Gruppen der thrombozytären PD-L1 Expression: Vergleich der Patientencharakteristika .....	70
Tabelle 12: Perzentilenberechnung und Gruppeneinteilung der Patienten, die unter einem anti-PD-1 Antikörper abgenommen wurden .....	74

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALK	anaplastische Lymphomkinase
cDNA	komplementäre DNA
Cp-Werte	Crossing point= Fluoreszenz steigt über die der Hintergrundstrahlung
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4; Immuncheckpointprotein
EGFR	Epidermal-growth factor- Rezeptor
FCS	Fetal calf serum /Fötales Kälberserum
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSCLC	Non-small cell lung cancer/ Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
o.A.	ohne Angabe
OS	Overall Survival/ Gesamtüberleben
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed cell death /CD279
PD-L1	CD274, B7-H1; Programmed cell death ligand-1
pPD-L1	thrombozytäres PD-L1
PFS	Progression-free-survival/ Progressionsfreies Überleben
sPD-L1	im Serum/Plasma gelöstes PD-L1

TRAP-6      Thrombin-receptor agonist peptide  
UICC        Union internationale contre le cancer

Größen:

kDa        Kilodalton  
ml         1/1000 l  
µl         Mikroliter 1/1000000  
rcf        relative centrifugal force/ Relative Zentrifugalkraft

# 1. Einleitung

## 1.1. Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)

In Deutschland erkranken jährlich mehr als 53 000 Menschen an einem Lungenkarzinom [1]. Lungenkrebs ist damit die zweithäufigste Krebserkrankung des Mannes und die dritthäufigste Krebserkrankung der Frau [2]. Die relative 5-Jahresüberlebensrate beträgt bei Männern ca. 16 % und bei Frauen ca. 20 % [1]. In Deutschland sterben jährlich mehr als 45 000 Menschen an dieser Erkrankung [3]. Weltweit ist Lungenkrebs die häufigste Todesursache unter den verschiedenen Krebsentitäten [4]. Als Hauptrisikofaktoren gelten vor allem das Rauchen, sowie der Kontakt zu Asbest oder eine genetische Prädisposition [4]. Durch unspezifische Symptomatik wie Husten, Atemnot oder Müdigkeit wird das Krebsleiden erst spät bemerkt [5]. Die Patienten sind bei Erstdiagnose meist zwischen 68 und 70 Jahre alt [2]. Zunächst wird bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom ein bildgebender Befund mittels Röntgen-Thorax oder der Computertomographie angestrebt [5]. Die endgültige Diagnose des Lungenkarzinoms erfolgt durch die invasive Probengewinnung: durch die Resektion des Tumors, einer Biopsie oder einer Zytologie, welche durch beispielsweise eine Bronchoalveoläre Lavage gewonnen werden kann, und anschließender histologischer Färbung der Probe [6]. Die häufigste histologische Form des Lungenkarzinoms ist das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) [2]. Das NSCLC lässt sich histopathologisch in zwei größere Unterformen einteilen: das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom [7]. Das Plattenepithelkarzinom macht ca. 30 % aller Lungentumore aus und enthält mehr Mutationen als das Adenokarzinom, welches 40 % der Lungenkarzinome ausmacht [7, 8]. Die pathologische Klassifikation dient der Klassifikation des Lungentumors, der Bestimmung des Differenzierungsgrades und der Bestimmung von Therapiemarkern [9].

Die weitere Ausbreitungsdiagnostik wird klassifiziert nach UICC 8 und setzt sich aus verschiedenen Kombinationen der TNM Stadien zusammen (vgl. Tabelle 1) [10].

Tabelle 1: Staging des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach UICC 8 [10] (modifiziert)

<b>UICC Stadium</b>	<b>Primarius</b>	<b>Lymphknoten</b>	<b>Metastasierung</b>
<b>I</b>	T1-T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>IIB</b>	T1-2b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1/2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/N1	M0
<b>IIIB</b>	T1/T2	N3	M0
	T3/T4	N2	M0
<b>IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1

Kurative Ansätze sind die Resektion und die Behandlung mit einer Radiochemotherapie [5]. Eine Resektion des Tumors und die Radiochemotherapie können nur bis zu einem UICC Stadium IIIa durchgeführt werden [2]. Anschließend kann der Patient eine platinbasierte adjuvante Chemotherapie erhalten [2]. Jedoch sind 70 % der Patienten bei Erstdiagnose bereits metastasiert und in einem UICC Stadium IV nicht mehr kurativ behandelbar [4]. Das 5-Jahres Überleben bei einem metastasiertem Stadium beträgt 2 % [11]. Eine mögliche Therapieoption bei einer Metastasierung ist die Chemotherapie oder eine tumorspezifische Therapie zur Verlängerung der Lebenszeit, sowie eine optimal symptomatische Therapie zur Reduktion tumorspezifischer Symptome [6]. Das Ansprechen auf eine Therapie wird durch regelmäßige bildgebende Verfahren, sowie Bestimmung von sogenannten Tumormarkern im Blut beobachtet [2].

Therapeutisch müssen im metastasierten Stadium zwei Patientengruppen unterschieden werden. Patienten, deren Tumor eine Treibermutation, wie

beispielsweise eine Mutation im EGF-Rezeptor, aufweist und Patienten, deren Tumor keine molekulare Anomalie aufweist [6]. Diese Einteilung basiert dabei meist auf der zuvor gewonnenen Biopsie des Tumors [6].

Patienten, deren Tumor eine molekulare Veränderung aufweist, werden mutationsspezifisch behandelt, beispielsweise mit Afatinib bei Nachweis einer Mutation im EGF-Rezeptor [6]. Andere häufige Mutationen sind die ALK-Translokation oder eine Translokation von ROS1, welche in der Erstlinientherapie mit Crizotinib behandelt werden [2]. Patienten, deren Tumor keine solche therapierelevante Mutation trägt, hatten bis vor einigen Jahren nur die Option einer platinbasierten Chemotherapie, beispielsweise eines Cisplatin/Gemcitabin- Regiments als Erstlinientherapie [12]. Die Ansprechrate auf eine platinbasierte Therapie liegt bei 19 %-30 % und das mediane Gesamtüberleben bei 8-9 Monaten [13, 14]. Zudem treten bei einer platinbasierten Therapie häufig hämatotoxische und neurotoxische Nebenwirkungen auf [7]. Als Zweitlinientherapeutikum stehen beim Adenokarzinom Docetaxel in Kombination mit Nintedanib und unabhängig von der histologischen Differenzierung des Tumors Ramucirumab oder Docetaxel als Monotherapie zur Verfügung [6]. Eine neuere Therapieoption stellen die sogenannten Immuncheckpointinhibitoren dar (vgl. Kapitel 1.4.).

## 1.2. Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine, anukleäre Bestandteile des Blutes [15]. Sie entstehen durch einen Abschnürungsprozess des Zytoplasmas von Megakaryozyten des Knochenmarks und der Lunge [15, 16]. Ein Mikroliter Blut enthält zwischen 150 000 bis 450 000 Thrombozyten [15]. Diese zirkulieren ca. sieben bis zehn Tage im Körper [17, 18]. Alte Thrombozyten werden in Leber und Milz abgebaut oder bei der Hämostase verbraucht [15]. Thrombozyten besitzen verschiedene Funktionen im Körper [19]. Durch die geringe Größe der Thrombozyten und die enorme Anzahl spielen sie eine wichtige Rolle in der Hämostase [20]. Außerdem sind Thrombozyten zur Regulation des Immunsystems [21] befähigt und tragen bekanntermaßen zur Tumorprogression bei [22]. Zur Ausübung ihrer Funktionen

enthalten Thrombozyten durch ihre Abschnürung bereits von den Megakaryozyten produzierte Proteine, nehmen Proteine durch Endozytose auf oder produzieren selbst Proteine, welche präformiert in Granula vorliegen [23]. Es werden die drei Formen dense Granula, alpha Granula und Lysosomen unterschieden [15]. Alpha Granula beinhalten Proteine wie beispielsweise Fibrinogen, P-Selektin oder auch den von-Willebrand-Faktor [18]. Dense Granula hingegen beinhalten beispielsweise ADP und Serotonin [20].

Obwohl Thrombozyten keinen Nucleus besitzen, können sie Proteine synthetisieren [24, 25]. 1988 wies Peter Newman erstmals mRNA im Thrombozyten mittels PCR nach [26]. Der Thrombozyt kann auf exogene Signale durch das Splicen von prä-mRNA und daran anschließender Proteinsynthese reagieren [27]. Man geht davon aus, dass vor allem die jüngeren Plättchen, in der Lage sind, vermehrte Proteinsynthese zu betreiben [28].

Durch Exposition des Thrombozyten an Kollagen, Thrombin oder ADP kommt es zur Aktivierung, die in einer Ausschüttung von alpha und dense Granula endet [29]. Durch die Sekretion dieser Proteine moduliert der Thrombozyt nicht nur die Funktion und Rekrutierung anderer Zellen, sondern verändert dabei vielmehr auch die Rezeptordiversität seiner eigenen Thrombozytenmembran [22]. Diese weist beispielsweise nach einer Aktivierung des Thrombozyten durch die Sekretion von alpha Granula vermehrt P- Selektin auf [30]. CD62P, wie P- Selektin dabei auch genannt wird, ist relevant für eine Interaktion der aktivierten Thrombozyten mit Neutrophilen und Monozyten [30], kann aber auch das Komplementsystem aktivieren [31].

Da die Thrombozytenaggregation in vielen Krankheitsbildern wie Koronare Herzkrankheit, Apoplex oder periphere arterielle Verschlusskrankheit eine Schlüsselrolle spielt, ist sie ein wichtiges pharmakologisches Target für die Primär- und Sekundärprävention dieser Erkrankungen [15]. Durch Medikamente, die gegen Enzyme der Thrombozyten gerichtet sind, wie beispielsweise das Enzym Cyclooxygenase 1 bei Acetylsalicylsäure oder gegen Rezeptoren der Thrombozytenmembran, wie beispielsweise gegen den

Adenosindiphosphatrezeptor P2Y<sub>12</sub> durch Clopidogrel, wird die Aktivierbarkeit der Thrombozyten und damit die Aggregation der Thrombozyten inhibiert [32].

Desweiteren übernehmen Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und Metastasierung von Tumoren [33]. So konnte gezeigt werden, dass hohe Thrombozytenzahlen bei Lungentumoren ein prognostischer Faktor für ein schlechteres Überleben ist [34]. Dies könnte durch Tumor-Plättchen-Interaktion erklärt werden, durch welche die Thrombozyten aktiviert werden und zahlreiche Proteine degranulieren [18]. Die Granula der Thrombozyten enthalten dabei nicht nur zahlreiche proangiogenetische Proteine [35], sondern auch Proteine, die das Immunsystem und damit auch die Rezeptorvielfalt des Tumormikroenvironment regulieren [36]. Mit der Sekretion von TGF $\beta$  kann die NK-Zellzytotoxizität herabreguliert werden oder mittels der Thrombozyten-Tumor-Interaktion kann das MHC-I Molekül vom Thrombozyten auf die Tumorzelle übergehen, sodass diese Tumorzelle einen „*pseudonormalen Phänotyp*“ vorgeben kann [36, 37]. Dadurch kann die Aktivität des Immunsystems herunterreguliert werden [37]. Auch infolge der Präsentation von immunregulatorischen Molekülen auf der Thrombozytenoberfläche, wie beispielsweise des GITR-Liganden, dessen Expression zum Coating der metastasierenden Tumorzelle führt, kann der Tumor vor NK-Zelllyse durch den Thrombozyten geschützt werden [38, 39]. Angesichts dieser Thrombozyten-Tumorinteraktionen stellt der Thrombozyt einen relevanten Bestandteil des Tumormikroenvironment [18] und damit einen möglichen Biomarker dar.

### 1.3. Die Immuncheckpointproteine PD-1 und PD-L1

Tumore entstehen durch eine Vielzahl an Mutationen und unterscheiden sich deshalb von normalem Gewebe [40]. Durch Mutationen und Alterationen, die sich in den Tumoren ansammeln, kann das Immunsystem den Tumor als „fremd“ erkennen und ihn angreifen [41]. Chen et al. haben 2014 diesen Kreislauf als sogenannten „*Cancer-immunity*“ Zyklus beschrieben (Abbildung 1) [42]. Um diesen Kreislauf zu durchbrechen, bilden die meisten Tumore ein

immunsuppressives Tumormikroenvironment aus, welches durch dysfunktionale Immunzellen geprägt ist [43]. Diese Dysfunktionalität der Immunzellen wird dabei durch verschiedene Zytokine oder durch die Interaktion von sogenannten Immuncheckpointmoleküle reguliert [44].

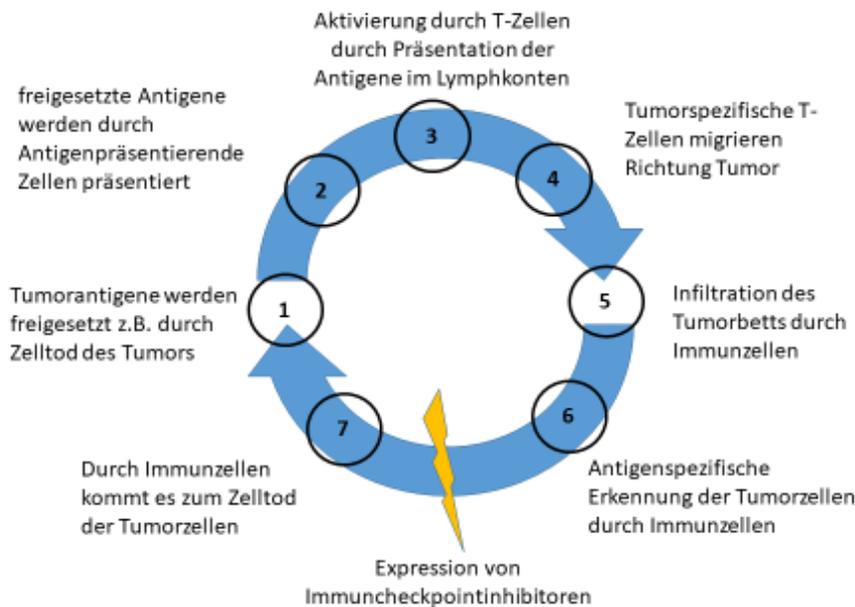


Abbildung 1: Cancer-immunity-circle. Modifiziert nach [42]

### 1.3.1. Programmed cell death 1 (PD-1)

PD-1 (CD279), ein Mitglied der CD28-Familie, ist ein Typ I Transmembranprotein, welches zur Ig-Superfamilie gehört [45, 46]. Das Gen für den Rezeptor PD-1 wurde als erstes in einer T-Zelllinie gefunden, die in Apoptose ging. Daher wurde dieses Gen als Programmed-cell-Death-1 bezeichnet [45].

Im Gegensatz zu anderen Immuncheckpointmolekülen wie CTLA-4 ist PD-1 als Monomer aufgebaut [46]. Das 55 kDa große Protein wird vor allem auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, aber nicht auf ruhenden Zellen exprimiert [47]. Zudem ist eine geringe Expression im Thymus, in der Milz, im Lymphknoten und Knochenmark

bekannt [47]. Ein PD-1 Defizit zeigte im Mausmodell Symptome einer Lupus-ähnlichen Glomerulonephritis [48], sowie einer autoimmunen dilatierenden Kardiomyopathie [49]. Dies legt die Vermutung nahe, dass PD-1 eine wichtige Rolle in der Inhibition von Autoimmunität und dem Erhalt des Gleichgewichts zwischen Toleranz und Reaktivität des Immunsystems spielt [50].

### 1.3.2. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1, B7-H1, CD 274)

Der Ligand PD-L1 (B7-H1), der auch als CD 274 bekannt ist, wurde 1999 zum ersten Mal beschrieben [51]. PD-L1 wird in den meisten Geweben nicht konstitutionell exprimiert [52]. Physiologisch ist eine nicht-hämatologische PD-L1 Expression in der Plazenta, den Tonsillen, im Thymus [53], PD-L1 RNA im Herz und in der Lunge beschrieben [54]. Zudem ist eine PD-L1 Expression auf verschiedenen Tumoren bekannt [52, 53]. Die Expression von PD-L1 kann sowohl auf Tumorzellen, sowie auf nicht-malignem Gewebe induziert werden [55, 56]. PD-L1 ist ein Transmembranmolekül Typ I, welches aus 290 Aminosäuren besteht und als Monomer aufgebaut ist [51]. Die meisten Aminosäuren von PD-L1 sind extrazellulär gelegen, unter anderem auch die IgV-Domäne, welche mit PD-1 interagieren kann [51]. Eine PD-L1 Interaktion ist sowohl für den Rezeptor PD-1 als auch für CD 80 bekannt [57]. Die Interaktion zwischen PD-L1 und CD 80 ist für die Erhaltung und Induktion von T-Zelltoleranz und der Inhibition der Alloimmunität bei Transplantationen relevant [58, 59].

PD-L1 wird konstitutiv nur auf wenigen Zelltypen exprimiert [53, 54]. Jedoch kann die PD-L1 Expression durch verschiedene Stimuli induziert werden [60]. Die Expression auf Makrophagen kann durch LPS, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und Interleukin 4 induziert werden [60]. Diese induzierbare PD-L1 Expression dient vor allem als Antwort auf eine Inflammation als Schutz des umliegenden Gewebes vor Kollateralschäden der Immunantwort [61].

Die Expression von PD-L1 wird postranskriptionell reguliert [62]. Ein Gehalt an PD-L1 mRNA konnte in vielen Organen gefunden werden, das Protein PD-L1 selbst konnte jedoch nur auf wenigen Zellen nachgewiesen werden [51, 52, 63, 64]. Die Translation von PD-L1 wird vor allem durch Splicen reguliert, wodurch

auch verschiedene Isoformen von PD-L1 entstehen können [62, 65]. Eine lösliche PD-L1 Isoform ist im Plasma und Serum gefunden worden [66, 67].

Die Regulation der Expression von PD-L1 auf Tumorzellen unterscheidet sich von der Expression auf nicht malignem Gewebe [68]. Es werden zwei verschiedene Regulationswege – einen externen und intrinsischen Regulationsweg unterschieden. Der Verlust oder die Mutation des PTEN-Protein kann beispielsweise zu einer Hochregulation von PD-L1 führen [69]. Durch eine aktivierende Mutation des RAS-Signalweg kann die Expression von PD-L1 durch eine verlängerte Stabilität der mRNA induziert werden [70].

Ein zweiter Regulationsmechanismus der PD-L1 Expression ähnelt der physiologischen Regulation von PD-L1 [52]. Auf malignem Gewebe wird diese Form der PD-L1 Expression als adaptive Immunresistenz bezeichnet [61]. Diese durch extrinsische Regulatoren beeinflusste PD-L1 Expression ist auf Interferon- $\gamma$  und Immunzellen zurückzuführen [52].

Auch prognostisch scheint die PD-L1 Expression von Tumorzellen eine Rolle zu spielen [71]. Eine PD-L1 Expression beim Melanom, Ösophaguskarzinom oder beim Nierenzellkarzinom scheint ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben zu sein [71–73]. Beim NSCLC konnte gezeigt werden, dass fast 75 % der Tumore mindestens eine Expression von 1 % bzw. mehr als ein Viertel eine Expression über 50 % zeigen [74].

### 1.3.3. PD-1/PD-L1 Interaktion

Die PD-1/PD-L1 Interaktion moduliert die periphere beziehungsweise die Immunantwort in sekundär lymphatischen Organen [75]. Die T- Zellaktivierung benötigt im Allgemeinen zwei verschiedene Rezeptor-Ligandeninteraktionen [76]. Eine davon ist die Interaktion des T-Zellrezeptors mit einem antigenträgenden MHC-Molekül und die andere ist die Interaktion von kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen [76]. Durch eine Stimulation

der T-Zelle werden koinhibitorische Moleküle induziert, sodass die PD-L1/PD-1 Interaktion als ein negativer Feedback-Mechanismus wirkt [77].

Durch eine Clusterbildung von TCR und PD-1 kommt der durch PD-L1 vermittelte koinhibitorische Signalweg in Gang [78]. Durch die zusätzliche Interaktion des Rezeptors PD-1 mit dem Liganden PD-L1 kommt es zur Phosphorylierung der beiden Tyrosinkinasmotiven ITSM und ITIM [79]. Okazaki et al. zeigten, dass die Phosphatasen SHP2 und SHP1 mit den phosphorylierten PD-1-Motiven assoziiert sind [80]. Vor allem bei einer Mutation des Tyrosinkinasmotiv ITSM ist die inhibitorische Regulation durch PD-1 verloren, weshalb man davon ausgeht, dass dieses Motiv für die Funktionsfähigkeit von PD-1 relevant ist [81]. Durch die Interaktion von PD-1 und PD-L1 oder bereits durch die T-Zellaktivierung kommt es damit zu einer gesteigerten Assoziation von SHP2 an ITSM des PD-1 [81]. Beispielsweise kommt es so zu einer PD-1 vermittelten Inhibition von PI3K und damit zu einer Inhibition der Akt-Aktivierung [82], indem die CK2 vermittelte Phosphorylierung von PTEN inhibiert wird und somit PTEN den PIP3-Spiegel senkt [83]. Durch diese Inhibition sinkt die Akt-Aktivierung und damit wird die Glykolyse [82], die Zytokinsynthese des Interleukin 2 und des Interferon- $\gamma$  [84], der Translokation des Glucosetransporters GLUT1 [85] sowie das Überleben der T-Zelle [86] beeinträchtigt. Zusätzlich zur Inhibition des PI3K-AKT-Signalwegs inhibiert die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 auch den RAS/MEK/ERK-Signalweg und vermittelt dadurch einen Zellzyklusarrest [87].

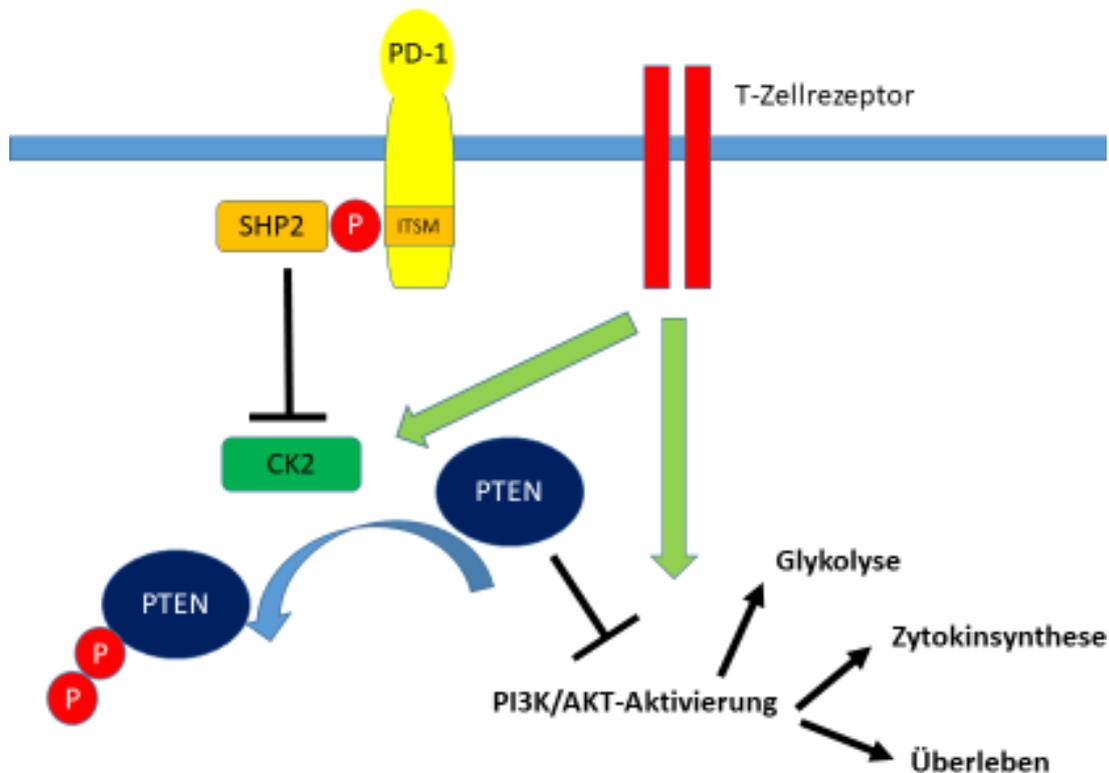


Abbildung 2: Signalweg einer PD-L1/PD-1 Interaktion (modifiziert nach [88])

#### 1.4. Immuncheckpointinhibitoren

Durch kostimulatorische und koinhibitorische Moleküle wird die T-Zellaktivierung reguliert [76]. Durch eine Überexpression von PD-L1 auf dem Tumor und der damit verbundenen PD-1/PD-L1 Interaktion mit dem PD-1 der T-Zelle wird die T-Zelle anergisch [89]. Somit ist bei dem Einsatz der Immuncheckpointinhibitoren nicht der Tumor als solches das Ziel, sondern vielmehr die Reaktivierung einer präexistentiellen zellulären Immunität gegen den Tumor [90].

Die Expression von PD-L1 auf dem Tumor ist ein Biomarker für ein Ansprechen auf Immuncheckpointinhibitoren [91, 92]. So konnte bereits beobachtet werden, dass Patienten, die PD-L1 auf ihrem Tumor exprimierten, ein signifikant besseres

Ansprechen auf eine Immuntherapie zeigten als Patienten, die keine Expression aufwiesen [93–95]. Jedoch ist die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen lokal sehr heterogen, weshalb Gewebeproben beschränkt aussagekräftig sind als Biomarker für das Ansprechen auf Immuntherapeutika [96]. Diese Problematik zeigt sich darin, dass es auch Patienten gibt, die ohne detektierbare PD-L1 Expression des Tumors auf eine Immuntherapie ansprechen [92]. Im Folgenden werden die jeweiligen Immuncheckpointinhibitoren kurz vorgestellt.

#### 1.4.1. anti-PD-1 Therapie

##### *Nivolumab*

Nivolumab (Opdivo) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper der IgG4 Familie, welcher durch den Konzern Bristol Myers Squibb (New York) vertrieben wird [97]. Nivolumab bindet hochaffin an die Bindungsstelle von PD-L1 auf dem Rezeptormolekül PD-1 [91, 98]. 240 mg Nivolumab wird therapeutisch bei Patienten mit NSCLC alle zwei Wochen intravenös verabreicht [97]. Die Serumhalbwertszeit beträgt 12-20 Tage und eine über 70 % Bindung an PD-1 auf zirkulierenden T-Zellen konnte noch 2 Monate nach einer Infusion von Nivolumab nachgewiesen werden [91]. In einer Studie als Zweitlinientherapeutikum gegenüber der Standardtherapie Docetaxel konnte dabei gezeigt werden, dass Patienten mit einer PD-L1 Expression auf dem Tumor zu einem höheren Prozentsatz auf Nivolumab ansprechen [99]. Zudem konnte ein geringeres Auftreten von schweren Nebenwirkungen, sowie ein besseres Gesamtüberleben unter Nivolumab im Vergleich zu Docetaxel beobachtet werden [99].

Nivolumab ist in Europa als Therapeutikum bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom, klassischem Hodgkin-Lymphom, plattenepitheliale Kopf-Hals-Tumor, Urothelkarzinom und Melanom, sowie nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom zugelassen [97]. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist Nivolumab als Zweitlinientherapeutikum zugelassen [100]. Ein Nachweis einer bestimmten tumorzellspezifischen PD-L1 Expression mittels den Klonen 5H1

oder 28-8 muss nicht erfolgen und konnte abschließend auch keinen Nachweis eines besseren Ansprechens auf Nivolumab bei positivem PD-L1 Nachweis erbringen [101]. Zwar konnte anfangs in einer Kohorte von 9 Tumorpatienten ein Trend zwischen 5-H1 gefärbtem PD-L1 und besserem Ansprechen detektiert werden, 2015 konnte dieser Effekt aber in einer größeren Kohorte nicht mehr nachgewiesen werden [91, 101].

### *Pembrolizumab*

Pembrolizumab (Keytruda) ist ein humanisierter monoklonaler IgG4-Antikörper gegen diverse diskontinuierliche Segmente des Rezeptors PD-1 der Firma Merck Sharp & Dohme (Kenilworth, New Jersey) [102]. Pembrolizumab konnte dabei bei einem Nachweis von PD-L1 auf dem Adenokarzinom in Studien ein längeres progressionsfreies Überleben nachweisen als die Standardtherapie Docetaxel [74]. Zudem zeigte sich, dass eine  $\geq 50\%$  PD-L1 Expression auf dem Tumor mit einer besseren Wirksamkeit von Pembrolizumab korrelierte [103]. Pembrolizumab ist in Europa für das klassische Hodgkin Lymphom, das Melanom, Kopf-Hals-Tumore, das Urothelkarzinom und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom zugelassen [104]. Beim NSCLC ist Pembrolizumab sowohl als Erstlinientherapie, als auch als Zweitlinientherapie zugelassen [105]. Als Erstlinientherapeutikum kann Pembrolizumab verwendet werden, wenn eine immunhistologische PD-L1-Expression durch den Klon 22C3 (Dako North America) von über oder gleich 50% auf den Tumorzellen nachgewiesen werden konnte und keine ALK-Translokation oder EGFR Mutation vorliegt [106]. Als Zweitlinientherapeutikum kann Pembrolizumab nach Versagen einer auf Platin basierenden Chemotherapie gegeben werden, aber auch nach Versagen einer ALK/EGFR-spezifischen Therapie [105]. Pembrolizumab wird alle 3 Wochen intravenös gegeben [106].

#### 1.4.2. anti-PD-L1

Im Gegensatz zur Inhibition von PD-1 unterscheidet sich die Inhibition von PD-L1 dadurch, dass es zu einer Blockade der Interaktion von PD-L1 mit B7.1. kommt und somit eine weitere Inhibition der Immunantwort verhindert wird [57, 58].

##### *Atezolizumab*

Atezolizumab ist ein von der Firma Roche/Genentech (Basel, Schweiz) entwickelter monoklonaler Antikörper der IgG1-Familie gegen den extrazellulären Teil von PD-L1 [107]. Atezolizumab wird alle 3 Wochen intravenös und gewichtsadaptiert gegeben und hat eine Serum-Halbwertszeit von 3 Wochen [108]. In Studien zeigte Atezolizumab eine durchschnittliche Ansprechrate bei Patienten mit NSCLC von 21% [109]. Dieses Ansprechen zeichnete sich dabei insbesondere beim NSCLC durch eine schnelle, lang anhaltende Regression des Tumors aus [109]. Herbst et al. zeigte einen Trend auf, dass Patienten mit einer Raucheranamnese besser auf eine Behandlung mit Atezolizumab ansprechen als Patienten ohne eine Raucheranamnese [109]. Das mediane progressionsfreie Überleben über alle untersuchten Entitäten hinweg war dabei 18 Wochen [109]. Im Vergleich mit Docetaxel erreichte Atezolizumab ein besseres Gesamtüberleben von 12,6 Monaten im Vergleich zu 9,7 Monate unter Docetaxel [110].

Das mögliche Ansprechen auf den PD-L1-Inhibitor Atezolizumab hängt dabei laut Fehrenbacher et al. und Herbst et al. davon ab, ob und in welchem Ausmaß der Tumor und die im Tumormikroenvironment gelegenen tumorinfiltrierenden Immunzellen PD-L1 exprimieren und damit als möglicher Marker für eine präexistente Immunantwort gegen den Tumor dienen können [109, 110]. Herbst et al. führt dabei das fehlende Ansprechen auf eine Inhibition mit einem PD-L1 Inhibitor auf drei Ursachen zurück: zum einen auf eine immunologische Ignoranz, eine nichtfunktionelle Immunantwort und ein Lymphozytenkollektiv, das den Tumor nicht ausreichend infiltriert [109].

Weitere PD-L1 Inhibitoren sind in der Entwicklung [102]. Zwei PD-L1 Inhibitoren haben bereits Zulassungen: Durvalumab für die adjuvante Therapie des NSCLC und der Radiochemotherapie [111], sowie Avelumumab beim metastasierten Merkelzell-Karzinom [112].

## 2. Zentrale Fragestellung

Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom ist die häufigste krebsbezogene Todesursache weltweit [113]. Durch Immuncheckpointinhibitoren konnte in Studien ein verlängertes Überleben der Patienten mit einem geringeren Grad an Nebenwirkungen erzielt werden [74, 99, 110]. Dabei zeigten einige Studien eine Korrelation zwischen der PD-L1 Expression auf dem Tumor und dem Ansprechen auf eine Therapie auf [74, 101, 103, 109, 110]. Eine solche Färbung erfordert eine geeignete Probe des Tumors, welche meist in einer zusätzlichen Biopsie gewonnen werden muss [114]. Im Hinblick auf die Multimorbidität der Patienten und der Tumorlokalisation gestaltet sich solch eine Biopsie schwierig. Zudem ist fraglich, ob eine solche Biopsie die Expression des gesamten Tumors repräsentieren kann [96]. Es profitieren jedoch auch klinisch auch Patienten, die keine immunhistologische PD-L1 Expression auf dem Tumor zeigen [92]. Demnach ist fraglich, ob eine PD-L1 Expression des Tumors als alleiniger Biomarker repräsentativ für ein Ansprechen auf eine Immuntherapie stehen kann [92, 96]. Mithilfe eines völlig anderen Biomarkers, der sowohl das Tumormikroenvironment repräsentiert, als auch einfach zu entnehmen ist, könnte diesen Patienten eine Chance auf eine klinisch vorteilhafte Therapie mit einem Immuncheckpointinhibitor gegeben werden, ohne dass sich der Patient einer weiteren Biopsie unterziehen muss.

Durch bereits beobachtete diverse Rezeptorübergänge von Thrombozyten auf den Tumor [37], könnte ein solcher Biomarker der Thrombozyt darstellen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob Patienten mit NSCLC eine vermehrte PD-L1 Expression auf Thrombozyten aufweisen und inwiefern diese Expression als Biomarker verwendet werden könnte.

Um dies zu erreichen, wurde eine prospektive Studie an Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom durchgeführt, die in der Medizinischen Klinik 2 des Universitätsklinikum Tübingen mit dieser Diagnose vorstellig wurden. Ziel der Dissertation war es zu klären, inwiefern Thrombozyten von Patienten mit NSCLC im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden PD-L1 exprimieren und inwiefern dieser Wert mit klinischen Parametern korreliert, um somit den „*malignen Plättchenphänotyp*“ von NSCLC-Patienten zu charakterisieren [115]. Besonderes Augenmerk wurde auf die Regulation, die Funktionalität als Biomarker bezüglich des Gesamtüberlebens und dem progressionsfreien Überleben und die Herkunft des thrombozytären PD-L1 gelegt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

Tabelle 2: verwendete Antikörper

##### Antikörper

Anti-human CD62P-FITC	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Anti-human CD41a-Vioblue	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-human CD274 -APC	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Mouse IgG1K-Isotypkontrolle,FITC	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Mouse-IgG1K-Isotypkontrolle-APC	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Rea-control (S)-VioBlue, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FcR Blocking reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	
Coagulation 9NC/10ml Sarstedt Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Röhrchen 5ml	Costar Corning, Tewksbury, MA
Falconröhrchen 15ml, 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen,
Fötiales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Merck, Darmstadt
Light cycler 480 Multiwell Platte 96	Roche, Penzberg
Light cycler 480 Sealing Foil	Roche, Penzberg
Nuclease free water	Promega, Madison, Wisconsin, USA
QIA Shredder	Qiagen, Hilden
PBS	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
PCR-Reaktionsgefäße 8er Strips	Biozym, Hessisch Oldendorf
Paraformaldehyde (PFA) 4% in PBS	Morphisto, Frankfurt am Main
Pipettenspitzen 10, 200, 1000, 1250µl	Eppendorf, Hamburg
PP-Microplate, 96 well, U-Form	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5; 1;5;2 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilterspitzen 10, 100, 1000µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
TRAP-6 (1mM in NaCl)	Tocris, Biotechnie; Wiesbaden- Nordenstadt

Tabelle 4: verwendete Kits und Primer

<b>Kits und Primer</b>	
Oligotex Direct mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
GoTaq qPCR Mastermix	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Quantitect Primer PD-L1	Qiagen, Hilden
Quantitect Primer TGF-β1	Qiagen, Hilden

Tabelle 5: verwendete Geräte

<b>Geräte</b>	
FACS Canto II	Roche, Penzberg
Light cycler LC480	Roche, Penzberg
Eppendorf mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
Pipette serologisch advant 2, 5, 10, 25, 50 ml	Costar Corning, Tewksbury, MA
Sysmex KX21-N	Sysmex, Norderstedt
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 6: verwendete Programme

<b>Programme</b>	
Citavi	Swiss Academic Software
FlowJo	FlowJo LLC
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Light Cycler Software 480	Roche, Penzberg
SPSS	IBM SPSS Statistics

### 3.2. Patientenrekrutierung

Für diese Studie wurde ein Probenkollektiv von 125 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom gesammelt. Die Studiengruppe war zusammengesetzt aus Patienten, die von Juli 2016 bis Oktober 2017 in der Medizinischen Klinik 2 des Universitätsklinikum Tübingen vorstellig wurden. Zudem wurden 49 Kontrollproben von Probanden ohne bekannte aktive Tumorerkrankung gesammelt.

Als Ausschlusskriterien für diese Studie galten ein Alter unter 18 Jahren, eine eingeschränkte Einwilligungsfähigkeit des Patienten, sowie eine Ablehnung der Teilnahme an der Studie. Patientenbezogene Daten wie UICC Stadium, Medikamente zum Zeitpunkt der Blutentnahme, Laborergebnisse, onkologische Risikofaktoren, sowie Begleiterkrankungen und Therapieverlauf wurden dokumentiert und sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt (Projekt-Nummer 456/2017BO2) und alle Teilnehmer haben in einer Einverständniserklärung die Teilnahme an dieser Studie erklärt (siehe Anhang). Zudem wurde diese Dissertation finanziell durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF)-Promotionskolleg der Universität Tübingen unterstützt (Projekt E0500496 (2017-1)).

### 3.3. Isolation von plättchenreichem Plasma

Für die Gewinnung der Thrombozyten wurde den Patienten nach Möglichkeit im Rahmen einer Routineblutentnahme Blut mittels einer 20G-großen Nadel in Citratröhrchen entnommen, um Scherkräfte und die damit verbundene Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Zur Isolation von plättchenreichem Plasma (PRP) wurde eine bereits beschriebene Methodik verwendet [36].

Die Citratröhrchen wurden bei 120rcf ohne Bremse mit einfacher Beschleunigung 20 min lang zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma zu gewinnen. Die obere flüssige Phase wurde vorsichtig in ein 15 ml Falcon mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen, um die darin enthaltenen Thrombozyten nicht zu aktivieren.

### 3.4. Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine Methodik, in welcher verschiedene Zelltypen anhand ihrer Größe oder diversen Oberflächenmolekülen differenziert und gezählt werden können [116]. Im Prinzip werden die mit verschiedenen

Fluorochromen markierten Zellen durch einen laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeführt und streuen dieses Laserlicht je nach ihrer Größe und Granularität [117]. Die Größe der Zelle wird dabei anhand der Vorwärtslichtstreuung (FSC) und die Granularität anhand des Seitwärtslichtstreuung (SSC) festgemacht [118]. Zusätzlich zur Lichtstreuung wird das Fluorochrom durch das Laserlicht zur Emission in einem bestimmten Wellenbereich angeregt [117]. Diese Streuung und Emission wird durch einen Detektor erkannt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches wiederum Rückschlüsse auf Größe, Granularität und Oberflächenmoleküle zulässt [117]. Zur Bestimmung der Autofluoreszenz von Zellen wird dabei für jeden Versuchsansatz eine separate Isotyp-Kontrolle verwendet, in welcher leichte und schwere Kette der Immunglobuline mit den jeweiligen gelabelten Fluorochromen enthalten sind. Mittels eines Hüllstroms werden Zellen an einem Laser vorbeigeführt. Durch den Laser werden Fluorochrome, mit denen Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle gelabelt sind, angeregt [117]. Die Emission, sowie die Streustrahlung durch die Größe und Granularität der Zellen werden mittels eines Detektors gemessen [118].

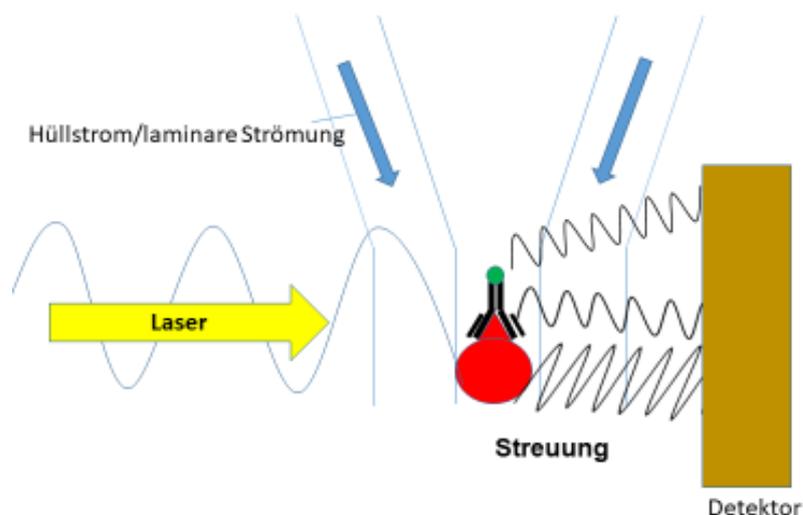


Abbildung 3: Funktionsschemata der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [119]).

### 3.4.1. Aufbereitung der Patientenproben für die Durchflusszytometrie

Pro Patient wurden zwei Versuchsansätze verwendet, die sich nur durch eine Aktivierung der Thrombozyten einer Probe durch TRAP-6 unterscheiden haben. Diese Aktivierung sollte zeigen, ob ähnlich wie beispielsweise CD62P auch PD-L1 präformiert in alpha-Granula der Thrombozyten vorliegt. TRAP-6, ein Peptidfragment des Protease-aktivierenden Rezeptors 1, stimuliert die Thrombozytenaggregation, induziert die Calciummobilisation und führt damit zu einer Aktivierung der Thrombozyten in vitro. Dazu wurde zunächst 500µl des PRP mittels 2,5 µl TRAP-6 (1mM in NaCl) über 2 min aktiviert, bevor sowohl das behandelte als auch das unbehandelte PRP mittels 500 µl Paraformaldehyd 10 min lang fixiert wurde, um weitere Stimulation der Thrombozyten durch das Pipettieren oder Zentrifugieren zu verhindern.

Anschließend wurden die Plättchen zweimal gewaschen: durch Zentrifugation bei 1000rcf für 8 min und anschließendem Abnehmen der oberen flüssigen Phase, sowie Wiederaufnahme des Pellets in 1 ml 1 % FCS in PBS wurden die Thrombozyten gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt und die Plättchen wurden in 80 µl PBS aufgenommen, um einen Fc-Rezeptorblock durchführen zu können.

Mittels Zugabe und Inkubation bei 4°C über 15 min von 20 µl humanem FcR-Blocking Reagent wurde eine unspezifische Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren verhindert. 60 µl 1 % FCS/PBS wurden zu der Probe hinzugegeben und 10 µl der Thrombozytensuspension entnommen. 10 µl der Thrombozytensuspension wurde anschließend mit 80µl PBS verdünnt und für eine Zellzahlanalyse am Sysmex verwendet.

Um ein ähnliches Thrombozyten-Antikörperverhältnis zu erhalten, wurde das plättchenreiche Plasma mit PBS auf  $12 \times 10^6$  Thrombozyten in einem Volumen von 150 µl verdünnt. Durch die sogenannte Fluoreszenz-minus-one Methodik konnte ein Überlappen der Laser in den APC Kanal durch Setzen der Gates mittels Fluoreszenz-Minus-One Probe reduziert werden. Dies konnte dadurch

erreicht werden, da in dem Fluoreszenz-minus-one FACS-Röhrchen alle Antikörper gegen das humane Antigen vorlagen, außer die zu untersuchende Farbe, die in diesem Röhrchen nur als Isotyp-Kontrolle gefärbt war.

Dann wurde das PRP zu je 50 µl in eine Mikroplatte aliquotiert und mit verschiedenen Antikörperpanels im Verhältnis 1:25 gefärbt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Antikörperpanel der 3 Versuchsansätze mit verwendeter Zellzahl und Volumen

	<b>Zellzahl</b>	<b>Antikörper Vioblue</b>	<b>Antikörper FITC</b>	<b>Antikörper APC</b>
<b>Isotyp-Kontrolle</b>	4*10 <sup>6</sup> Thrombozyten in 50µl	2 µl Iso- Vioblue	2 µl Iso- FITC	2 µl Iso- APC
<b>Fluoreszenz-minus-one</b>	4*10 <sup>6</sup> Thrombozyten in 50µl	2 µl CD41a- Vioblue	2 µl CD62P- FITC	2 µl Iso- APC
<b>Versuchsansatz</b>	4*10 <sup>6</sup> Thrombozyten in 50µl	2µl CD41a- Vioblue	2 µl CD62P- FITC	2 µl CD274- APC (MIH1)

Anschließend wurde die Platte für eine halbe Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 1000rcf 8 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde in FACS-Röhrchen 200 µl PBS vorgelegt. Der Überstand der Platte wurde verworfen und das Pellet wurde mit 200 µl PBS in die bereits vorbereiteten FACS-Röhrchen überführt. Nach Möglichkeit wurden die Proben innerhalb von 24h mittels FACS Canto II analysiert, indem 50 000 Zellen je Probe aufgenommen worden sind. Die generierten Daten wurden mit FlowJo analysiert und als Dotplot bzw. Histogramme (Abbildung 4) dargestellt.

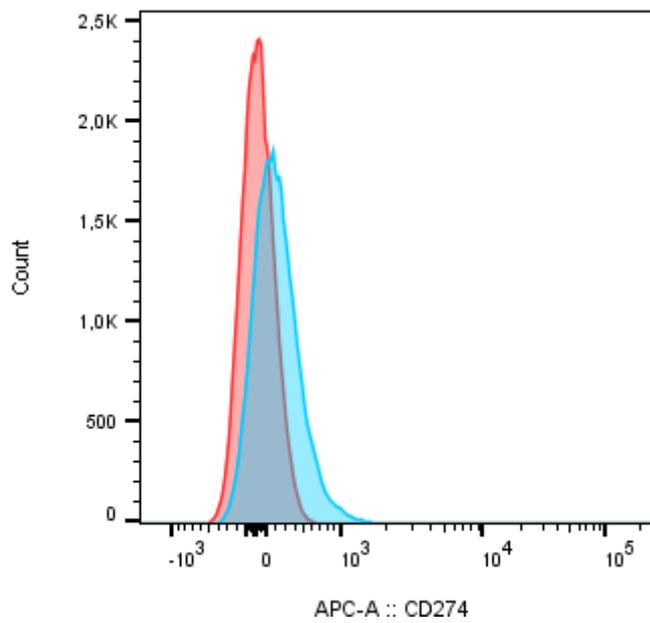


Abbildung 4: Histogrammdarstellung der gemessenen PD-L1 Expression (hier in APC); in blau dargestellt die Fluoreszenz-minus-one Probe und in rot der Versuchsansatz

### 3.4.2. Gatingstrategie

Anhand der Fluoreszenz-minus-one Methodik und der folgenden Gatingstrategie konnte durch Verunreinigung des plättchenreichen Plasmas bedingte Messfehler verringert werden.

Anhand der Isotypprobe wurde versucht, mithilfe des Vorwärts-Seitwärts-(FSC/SSC)- Streuungsdiagramms die lebende Thrombozytenpopulation durch Setzen des Gates „G1-lebende Thrombozyten“ einzuschließen. Da Membranreste eine ähnliche Größe wie Thrombozyten aufweisen, wurden die Zellen auf eine Expression von CD41a, einem Thrombozytenspezifischen Antigen, anhand eines CD41a-Vioblue/FSC-Streuungsdiagramm untersucht und konnten somit als Thrombozyten verifiziert (Gate: CD41a\_Vioblue+) werden. Es konnte sichergestellt werden, dass eine CD41a-Expression von ca 99 % vorlag. Im vorliegenden Beispiel (Abbildung 5) beträgt die CD41a- Expression des Gates G1-lebende Thrombozyten 99,7% und ist damit fast frei von anderen Zellbestandteilen. Mittels der CD62P- Expression wurde anschließend die Thrombozytenaktivierung der Proben ermittelt. Dazu wurde analog zur CD41a-Bestimmung, anhand eines CD62P/FSC-Streuungsdiagrammes ein CD62P-Gate definiert. In diesem Beispiel beträgt die Aktivierung und damit die CD62P-Expression der Thrombozyten ohne vorherige TRAP Stimulation 24,1 %. Anhand der Fluoreszenz-minus-one Probe konnte anschließend das Gate für CD274 in einem CD274/FSC Streudiagramm festgelegt werden. In diesem Patientenbeispiel zeigt der Patient im Versuchsansatz eine PD-L1 Expression von 6,1 %.

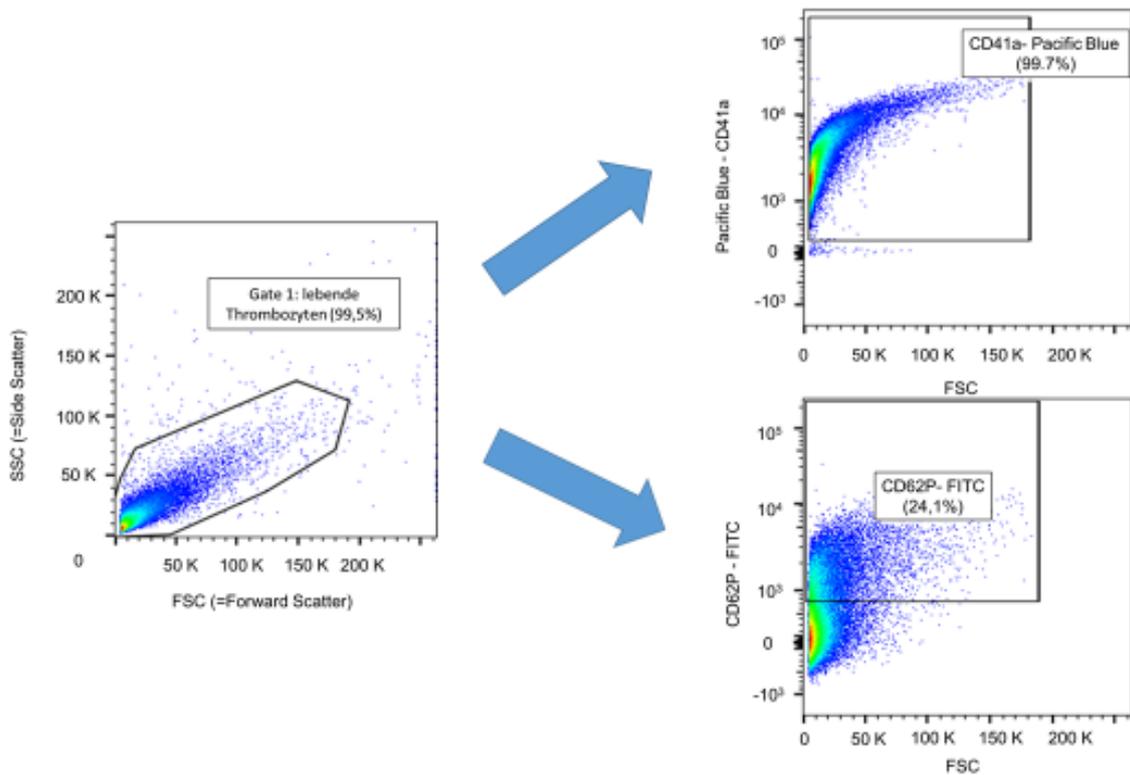


Abbildung 5: Mittels FSC/SSC- Streuungsdiagramms wird auf die Thrombozyten gegated. Dann wird diese Population (G1-lebende Thrombozyten), auf Expression von CD41a untersucht, um zeigen zu können, dass sie das thrombozytenspezifische CD41a exprimiert und somit nur Thrombozyten enthält. Dann wird Population G1 auf den Aktivierungsmarker CD62P (Gate: CD62P-FITC) untersucht.

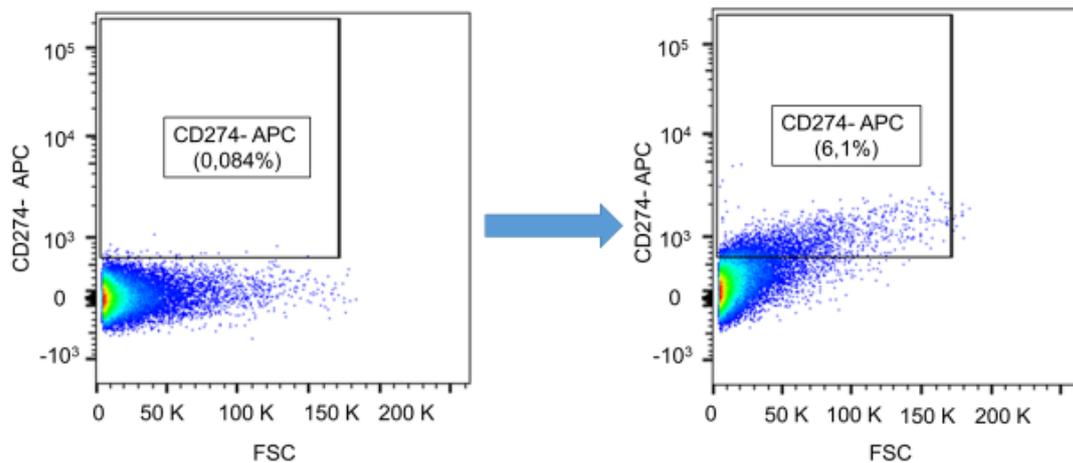


Abbildung 6: Mittels dem Versuchsansatz Fluoreszenz-minus-one konnte das Gate für das zu untersuchende Protein PD-L1 oder CD274 in der Farbe APC gelegt werden. Und mit dem anti-human gerichteten Antikörper konnte eine Detektion von 6,1 % CD274-positiver Zellen detektiert werden.

### 3.5. PCR

Um der Frage nachgehen zu können, ob der Thrombozyt selbst die thrombozytäre PD-L1 Expression durch mRNA-Expression regulieren kann, wurde aus Thrombozyten mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Realtime-PCR auf PD-L1 mRNA untersucht.

Die Methodik der quantitativen Real Time-Polymerase-Reaktion (qPCR) wird sowohl in der Diagnostik als auch in der Forschung verwendet und ist dort bereits etabliert. Die Real-Time-Polymerase-Reaktion wird dabei verwendet, um die aus Blutproben oder Zell- und Gewebeproben extrahierte DNA oder RNA auf bestimmte Genexpressionsmuster zu untersuchen [120]. Hierbei wird komplementär zu der gewonnenen mRNA durch eine spezielle RNA-abhängige

DNA-Polymerase, einer Reversen Transkriptase, komplementäre Stränge, sogenannte cDNAs, hergestellt. Diese cDNAs können dann für eine PCR genutzt werden.

### 3.5.1. mRNA-Isolation aus Thrombozyten

Da Thrombozyten sehr wenig mRNA enthalten, wurde für die mRNA-Isolation aus Thrombozyten ein Oligotex Direct mRNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls [121]. Für die Extraktion von mRNA aus Thrombozyten wurden Thrombozytenpellets verwendet, die wie folgt aus dem gewonnenen PRP hergestellt wurden: Zunächst wurde das aus den Citratmonovetten gewonnene PRP zu je 500 µl aliquotiert. Durch Zentrifugation bei 1000rcf für 8 min wurden Thrombozytenpellets gewonnen, indem nach der Zentrifugation die flüssige Phase abgenommen und verworfen wurde. Anschließend wurden die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Initial wurden die Thrombozytenpellets mittels Mercaptoethanol versetztem OL1 Puffer lysiert und anschließend mit Hilfe einer Qia Shredder Spin column bei 14000rcf aufgebrochen. Um Zelltrümmer und Proteine aus der Probe zu entfernen, wurde 1,2 ml ODB Puffer zu der Probe hinzugegeben und für 3 min bei 14000rcf zentrifugiert. Das dadurch entstandene Pellet wurde verworfen und zum Überstand wurden 35 µl einer zuvor auf 37°C erwärmten Oligotex Suspension gegeben. Für eine erfolgreiche Hybridisierung zwischen den OligodT30 und dem PolyA- Ende der mRNA, wurde das Probe-Oligotex-Gemisch 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt folgte die Pelletierung der Oligotex:mRNA- Hybriden durch Zentrifugation bei 14000rcf für 5 min, und die neu entstandene wässrige Phase wurde verworfen. Das Pellet wurde zur weiteren Verwendung durch den mit β-Mercaptoethanol versetzten OL1 Puffer resuspendiert und mit 400 µl Puffer OD versetzt und zuerst bei 70°C für 3 min in einem Wasserbad und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente der Anreicherung der Poly-A-mRNA durch Reduktion der rRNA in der Probe. Zudem wurden die Oligotex-mRNA-Hybride durch

Zentrifugation bei 14000rcf pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mittels 350µl OWI Puffer resuspendiert und auf eine Small Spin Column pipettiert. Anschließend wurde die Säule bei 14000 rcf 5 min lang zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen, um so mögliche Verunreinigungen abzutrennen. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß gesteckt und mit 350µl Waschpuffer OW2 durch erneute Zentrifugation bei 14000rcf gewaschen und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde ein weiteres Mal mit Waschpuffer OW2 gewaschen und anschließend in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. 20 µl eines 70°C heißen Puffer OEB wurde auf die Säule gegeben und auf der Säule wurde dieser Puffer nochmals auf- und abpipetiert, um die mRNA aus der Säule herauszulösen. Anschließend wurde die Säule bei 14000rcf 1 min lang zentrifugiert und die gewonnene mRNA aus dem Eluat zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### 3.5.2. Umschreibung in cDNA

Um die gewonnene mRNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein QuantiTect RT-Kit von Qiagen verwendet. Dabei wurden 18 µl der gewonnenen mRNA mittels 3 µl gDNA-Wipeoutbuffer von genomischer DNA getrennt und bei 42°C für 2 min in einem Eppendorf Mastercycler aufgereinigt. Anschließend wurde 6 µl Quantiscript RT Buffer 5x, 1,5 µl Reverse Transcriptase MM und 1,5 µl RT-primer-Mix zu der aufgereinigten mRNA gegeben. Die cDNA wurde anschließend im Mastercycler für 15 min bei 42°C synthetisiert und bei 95°C 3 min lang inkubiert, um eine Denaturierung der Proteine und der RNA zu erreichen. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.5.3. Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR baut auf der Methodik der PCR auf. Dabei enthält das Reagenz GoTaq qPCR von Promega eine

Doppelstrang-DNA- bindende Komponente und emittiert Licht, wenn es an doppelsträngige DNA bindet. Dadurch kann die Entstehung von doppelsträngiger DNA quantitativ detektiert werden. Der hier verwendete Primer von Qiagen erkennt die längste Isoform der PD-L1 mRNA [122].

Durch einen Roche Light Cycler 480 wurde die quantitative Genexpression von PD-L1 mittels qRT-PCR bestimmt. Die Proben wurden dabei als Dubletten gemessen und als Referenzgen wurde TGF $\beta$ 1 verwendet, um in der Auswertung eine relative Menge von PD-L1 mRNA bestimmen zu können. TGF $\beta$ 1 wurde hierbei verwendet, da andere übliche Housekeeping Gene bei Thrombozyten nicht in relevanter Menge exprimiert werden. 12,5  $\mu$ l des GoTaq qPCR Mastermix wurde zusammen mit 2,5  $\mu$ l Aqua bidest. und 2,5  $\mu$ l des jeweiligen Primers gemischt und anschließend wurde diese Suspension zusammen mit 7,5  $\mu$ l der oben synthetisierten cDNA in eine 96-Multiwell-Platte pipettiert. Alle Schritte fanden auf Eis statt. Die Platte wurde vor der Messung im Light Cycler bei 600rpm eine Minute lang zentrifugiert. Im Light Cycler wurde die DNA zunächst 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend mittels 45 Zyklen von Denaturierung bei 95°C und Hybridisierung und Elongation bei 60°C quantifiziert. Die gemessenen Daten wurden anschließend am Light Cycler-Programm Light Cycler 480 Software ausgewertet. Dazu wurden die sogenannten Cp-Werte, welche den Zyklus beschreiben, in welchem das Fluoreszenzsignal über den Hintergrund-Fluoreszenzsignalen liegt, sowohl von TGF $\beta$  als auch von PD-L1 bestimmt. Dann wurden diese Cp-Werte wie folgt miteinander verrechnet: Cp (PD-L1)/ Cp (TGF $\beta$ ) und dann aus den Dupletten der Mittelwert berechnet und für eine einfachere Darstellung mit 10000 multipliziert.

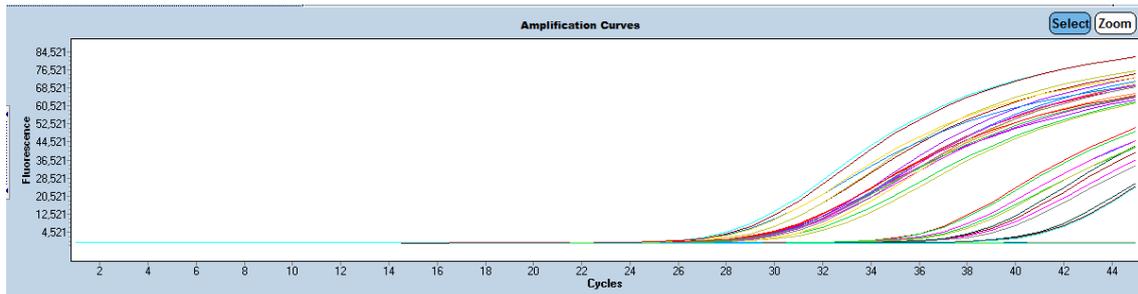


Abbildung 7: Darstellung der Amplifikationskurven der PCR in der Light Cycler Software 480

### 3.6. Auswertung und Statistik

122 der gesammelten 125 Patienten konnten durchflusszytometrisch ausgewertet werden.

Von den 49 gesammelten Kontrollen wurden zwei Patienten aufgrund der Diagnostik einer Erkrankung, bei der eine PD-L1 Expression vorbeschrieben ist, aus der Wertung genommen. Ein Kontrollproband wurde mit Verdacht auf ein septisches Geschehen auf die Intensivstation verlegt und bei dem anderen Probanden stellte sich eine aktive Tumorerkrankung dar.

Die Zielvariable thrombozytäres PD-L1 stellte sich in der deskriptiven Statistik als nicht normalverteilt dar. Um für die statistische Analyse parametrische Verfahren anwenden zu können, wurden deshalb die thrombozytäre PD-L1 Werte logarithmiert. Durch eine Logarithmierung konnte eine Normalverteilung erreicht werden. Im Folgenden wurden bei der statistischen Analyse der durchflusszytometrischen Daten die normalverteilten Daten verwendet. In Tabellen und Grafiken werden die nicht logarithmierten Werte dargestellt, mit den Signifikanzen, die durch die normalverteilten Daten errechnet wurden. Bei der Korrelationsanalyse von thrombozytärem PD-L1 mit Laborparametern wurden die nicht normalverteilten Daten verwendet und mittels Spearman-Korrelation verglichen. Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit basierte zum einen auf den Daten von 122 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, welche von Juli 2016 bis Oktober 2017 in der Onkologie der Medizinischen Klinik 2 vorstellig wurden (Tabelle 9) und zum anderen auf den Daten von 47 Kontrollprobanden (Tabelle 8). Kontrollprobanden waren Patienten oder Mitarbeiter, bei welchen weder eine aktive Tumorerkrankung noch eine schwere systemische Infektion bekannt war.

Tabelle 8: Kontrollprobandencharakteristika

<b>Kontrollprobanden</b>	<b>Absolut</b>	<b>relativ</b>
	<b>n=47</b>	
<b>Geschlecht</b>		
• Männer	n=12	25,5%
• Frauen	n=35	74,5%
<b>Alter (in Jahren)</b>	Median: 41 Älteste/r: 88 Jüngster: 20	

53 % der in dieser Studie eingeschlossenen NSCLC- Patienten waren männlich. Bei Blutentnahme wiesen 85 % der Patienten eine Metastasierung auf (Stadium IV nach UICC). Im Median erfolgte die Blutentnahme unter Erstlinientherapie. Bei Blutentnahme waren 43 % der Patienten in der Erstlinie, 25 % in einer Zweitlinientherapie und 18 % in der dritten bzw. einer anderen weiterführenden Therapielinie. 31 % der Patienten wurden unter Therapie mit einem Immuncheckpointinhibitor abgenommen, 8 % aller Patienten wurden unter dem PD-L1 Inhibitor Atezolizumab abgenommen. Die kürzeste Nachbeobachtungszeit betrug 3 Monate; die längste 18 Monate. Die Patienten

wurden im Durchschnitt 10 Monate nachbeobachtet. 47 Patienten waren zum Ende des Beobachtungszeitraums im Dezember 2017 verstorben.

Tabelle 9: Patientencharakteristika der NSCLC-Patienten

<b>NSCLC-Patienten</b>	<b>Absolut n=122</b>	<b>relativ</b>
<b>Geschlecht</b>	Frauen n=57	46,7%
	Männer n=65	53,3%
<b>Alter</b>	Median: 66	
	Jüngster: 19	
	Ältester: 87	
<b>Raucherstatus</b>		
• Raucher	n=91	74,5%
• Nicht-Raucher	n=14	11,4%
• o.A.	n=17	13,9%
<b>UICC-Stadium</b>		
bei n=121 bekannt		
• I	n=1	0,8%
• II	n=5	4%
• III	n=11	9%
• IV	n=104	85,9%
<b>Histologie</b>		
• Adenokarzinom	n=92	75,5%
• Plattenepithelkarzinom	n=30	24,3%
<b>Therapielinie</b>		
• Vor Erstlinie	n=15	12,3%
• Erstlinie	n=53	43,4%
• Zweitlinie	n=31	25,4%
• Drittlinie/höhere Linie	n=16	13,1%
• adjuvant	n=7	5,7%

<b>Unter Immuntherapie</b>	n=38	31,2%
• anti-PD-1	n=28	23%
• anti-PD-L1	n=10	8,2%
<b>Mutationsnachweis</b>		
• KRAS	n=28	23%
• ALK	n=4	3%
• EGFR	n=20	16%
<b>Kein Gerinnungshemmer</b>	n=57	46,7%
<b>Gerinnungshemmer</b>	n=40	32,7%
• ASS/Clopidogrel	n=28	22,9%
• Heparin	n=12	9,8%
• o.A.	n=25	20,5%

## 4.2. Detektion von thrombozytärem PD-L1

### 4.2.1. Untersuchung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten

Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mittels des Thrombozytenaktivators TRAP-6 wurde der Frage nachgegangen, inwiefern durch Degranulierung und der damit verbundenen Zunahme der Oberflächenmoleküle auch eine Zunahme der PD-L1 Expression der Thrombozyten erreicht werden könnte. Dazu wurden die durch Fluorochrome markierten CD62P-Rezeptoren, sowie die PD-L1 Expression auf Thrombozyten untersucht.

Es wurde die Präaktivierung ohne zusätzliche Zugabe von TRAP-6 im Vergleich zu mit TRAP-6 stimulierten Thrombozyten beobachtet. Hierbei wurde die CD62P-Expression untersucht, welche als Marker für eine Thrombozytenaktivierung gilt. Die nicht durch TRAP-6 stimulierte Probe zeigte im Median bei Patienten mit NSCLC eine CD62P-Expression von 26 %, bei den gesunden Kontrollprobanden eine Expression von 26,7 %. Durch eine unspezifische Aktivierung mit TRAP-6 konnte im Median eine CD62P-Expression von 72 % bei Patienten mit NSCLC nachgewiesen werden und bei den

Kontrollprobanden eine CD62P-Expression von 83 % (Abbildung 8). Damit konnte ein signifikanter Anstieg des Rezeptors CD62P nach Aktivierung mittels TRAP 6 sowohl bei den gesunden Kontrollprobanden als auch bei den Patienten mit NSCLC detektiert werden (Vorzeichentest für verbundene Stichproben  $p < 0,001$ ).

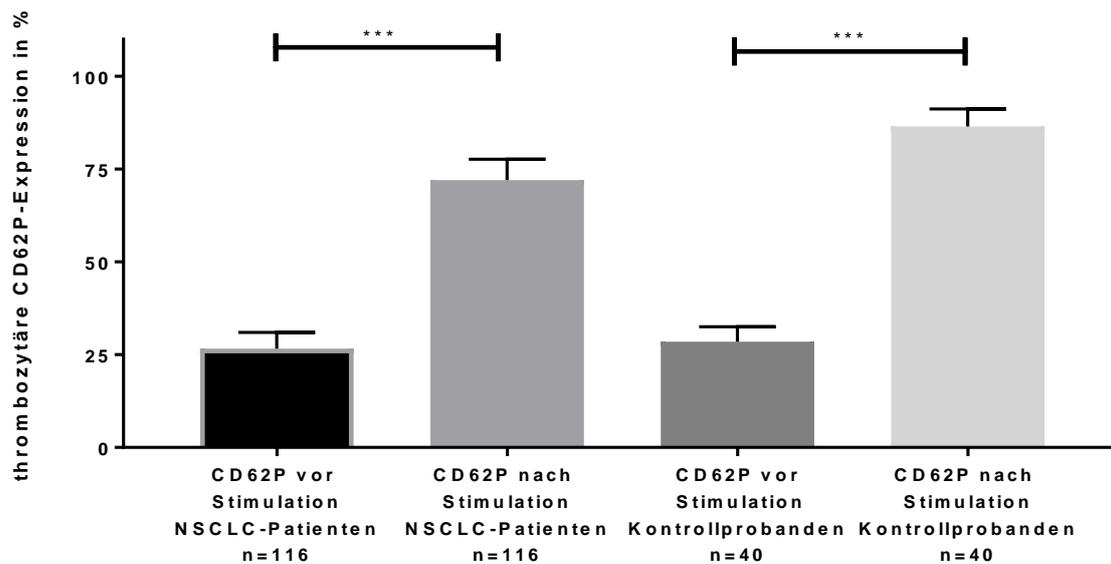


Abbildung 8: Dargestellt ist die CD62P- Expression der Thrombozyten von NSCLC-Patienten und Kontrollprobanden vor und nach Stimulation mittels TRAP-6 (Vorzeichentest für verbundene Stichproben  $p < 0,001$ ). Dargestellt sind 95 CI des Medians.

#### 4.2.2. Thrombozytäres PD-L1 auf unstimulierten Thrombozyten

Mit Anti-PD-L1 gerichteten Antikörpern wurden Thrombozyten durchflusszytometrisch auf eine Expression von PD-L1 untersucht. Mittels dieser Methodik sollte das Immuncheckpointprotein PD-L1 auf Thrombozyten nachgewiesen werden.

Thrombozytäres PD-L1 konnte sowohl auf Thrombozyten von gesunden Kontrollprobanden als auch von Patienten mit NSCLC nachgewiesen werden (Abbildung 9). Gesunde Kontrollprobanden exprimierten im Median 0,29 % der Thrombozyten PD-L1 auf ihrer Oberfläche, wohingegen im Median 0,89 % der Thrombozyten der Patienten mit NSCLC PD-L1 Expression exprimierten. Die Expression von PD-L1 war dabei bei Patienten mit NSCLC im Vergleich zu den Kontrollpatienten signifikant erhöht (t-test Kontrollpatienten vs. Tumorpatienten  $p < 0,001$ , Daten logarithmiert). Die Werte der thrombozytären PD-L1 Expression wiesen bei den Patienten mit NSCLC eine große Streuung auf.

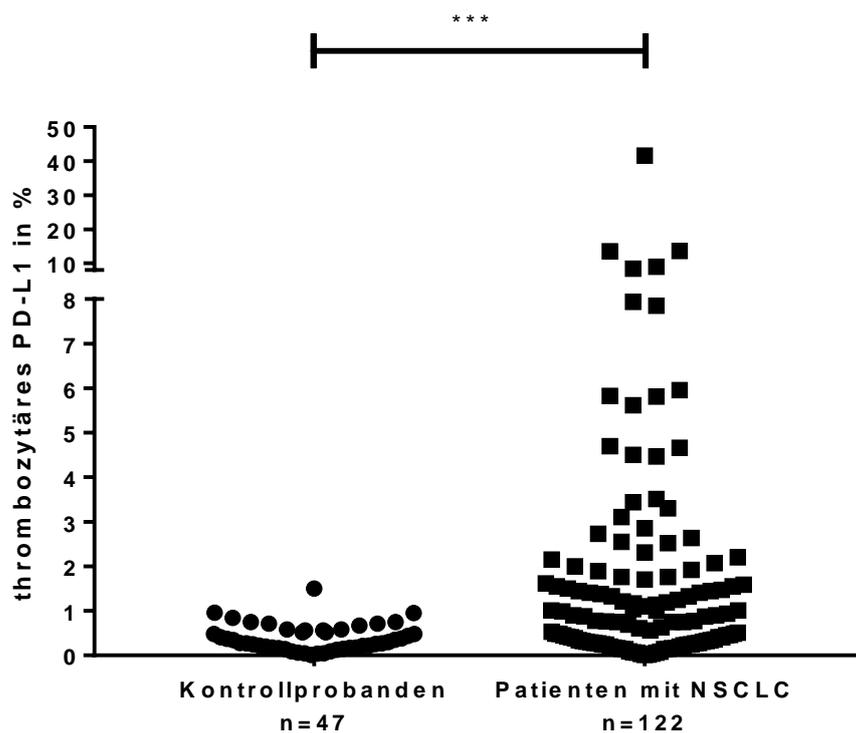


Abbildung 9: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Tumorpatienten mit NSCLC im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten ohne Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP-6 (t-Test  $p < 0,001$ )

#### 4.2.3. PD-L1 Expression auf stimulierten Thrombozyten

Mittels TRAP-6 Stimulation wurde untersucht, ob die PD-L1 Expression auf Thrombozyten durch Aktivierung reguliert werden kann.

Im Vergleich zu den unbehandelten Tumorpatientenproben und Kontrollpatientenproben stieg die PD-L1 Expression im Median signifikant an (Korrelation bei gepaarten Stichproben: Tumorpatienten unstimuliert vs. Tumorpatienten stimuliert  $p < 0,0001$ ; Kontrollpatienten unstimuliert vs. Kontrollpatienten stimuliert  $p < 0,0001$ , Daten logarithmiert) (Abbildung 10).

Durch Stimulation mittels TRAP-6 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von Tumorpatienten und Kontrollpatienten (t-Test  $p < 0,0001$ ; Daten logarithmiert) nachgewiesen werden (Abbildung 11). Jedoch fällt auch auf,

dass nicht alle Patienten durch eine Aktivierung eine höhere PD-L1 Expression zeigten, sondern bei einigen sank die PD-L1 Expression nach Aktivierung.

Diese Daten zeigten, dass durch Aktivierung der Thrombozyten sowohl bei Patienten mit NSCLC als auch bei Patienten ohne Tumorerkrankung die PD-L1 Expression auf Thrombozyten reguliert werden konnte.

Bei Tumorpatienten steigt der Anteil der PD-L1-positiven Thrombozyten deutlich (Abbildung 10, Abbildung 11).

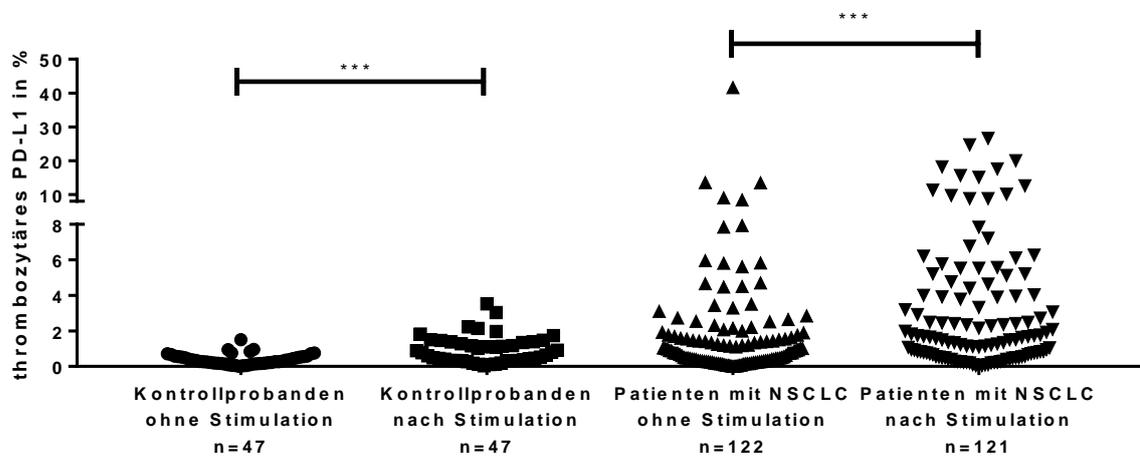


Abbildung 10: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression vor und nach Stimulation mittels TRAP-6 (t-test  $p < 0,001$ ).

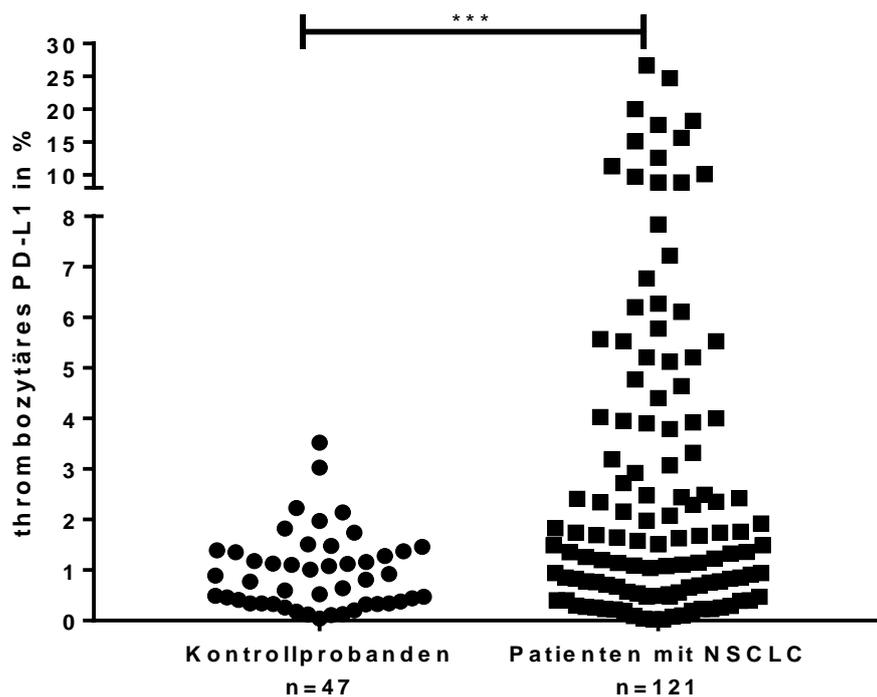


Abbildung 11: Thrombozytäre PD-L1 Expression der Kontrollprobanden im Vergleich zu der thrombozytären PD-L1 Expression der Patienten mit NSCLC nach Stimulation mittels TRAP-6 (t-test  $p < 0,001$ ).

#### 4.3. PD-L1 Langzeitverlauf

Um eine mögliche Funktionalität als Biomarker, zum Beispiel für ein mögliches Ansprechen auf eine Therapie zu überprüfen bzw. das Verhalten des thrombozytären PD-L1 im Zeitverlauf zu veranschaulichen, wurde bei zwei Patienten eine wiederholte Analyse der thrombozytären PD-L1 Expression durchgeführt. Eine Patientin wurde vor und unter Erstlinientherapie Carboplatin/ Pemetrexed und ein Patient vor und unter dem Zweitlinientherapeutikum Pembrolizumab ausgewählt. Dabei wurde bei jeder Blutentnahme die thrombozytäre PD-L1 Expression ohne Aktivierung und die Expression nach einer Aktivierung mittels TRAP-6 untersucht.

Bei der chemo-naiven, erstdiagnostizierten Patientin konnte bei Erstabnahme eine PD-L1 Expression von 41,6 % detektiert werden (Abbildung 12). Durch eine Stimulation mittels TRAP-6 sank diese Expression auf 24,7 % ab. Im Gegensatz zu dem Verhalten anderen Patiententhrombozyten sank die Expression unter Stimulation mittels TRAP-6 ab. Im Verlauf konnte unter der Carboplatin/Pemetrexed Therapie ein computertomografisches Ansprechen gezeigt werden. Die thrombozytäre PD-L1 Expression fiel auf unter 10 % des Ausgangswertes ab. Die thrombozytäre PD-L1 Expression stieg ab Woche 43 leicht an, wohingegen durch eine Aktivierung der Thrombozyten eine deutliche Expressionssteigerung des PD-L1 der Thrombozyten erreicht werden konnte. Computertomografisch war die Tumormanifestation bis zuletzt befundkonstant.

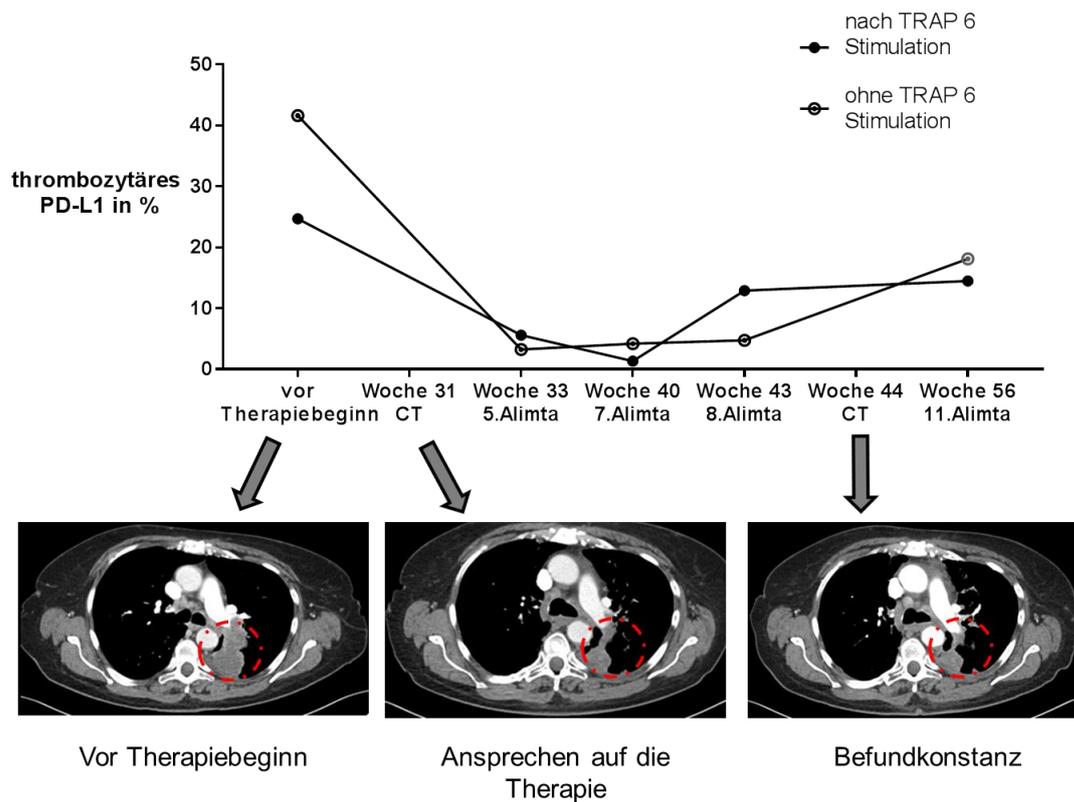


Abbildung 12 Thrombozytäre PD-L1 Expression im Verlauf unter Carboplatin/Pemetrexed-Therapie. Dargestellt sind sowohl die thrombozytäre PD-L1 Expression mit und ohne TRAP-6 Stimulation. Zusätzlich sind die computertomografischen Befunde dargestellt.

Als zweiter Patient, der im Rahmen dieser Studie für mehrere Wochen untersucht wurde, wurde ein Patient ausgewählt, der unter der Beobachtungszeit von einer platinbasierten Chemotherapie auf einen Immuncheckpointinhibitor umgestellt wurde. Ziel dieser Langzeitbeobachtung war es herauszufinden, inwiefern sich thrombozytäres PD-L1 unter Einfluss eines Checkpointinhibitors entwickelte.

Die erste Blutentnahme erfolgte unter der Therapieerhaltung im 8. Zyklus Pemetrexed nach sechs Zyklen Cisplatin/Pemetrexed. Durchflusszytometrisch zeigte sich eine PD-L1 Expression von 2,3 %, die sich durch eine Stimulation mittels TRAP-6 auf 7,8 % steigern lies (Abbildung 13). Im weiteren Verlauf trat computertomografisch eine Progression der Grunderkrankung auf, weshalb der

Patient auf das Zweitlinientherapeutikum Pembrolizumab umgestellt wurde. Vor dem zweiten Zyklus Pembrolizumab wurde erneut Blut abgenommen und im Vergleich zum Ausgangswert unter Pemetrexed war das thrombozytäre PD-L1 auf 1,54 % gesunken. Nach Stimulation mit TRAP-6 sank die thrombozytäre PD-L1 Expression im Vergleich zur vorherigen Blutentnahme und Stimulation auf 25 % des Ausgangswertes auf 2% ab. In der 51. Beobachtungswoche zeigte sich im CT eine Größenkonstanz des Tumors. Im Verlauf der weiteren Beobachtung stieg die thrombozytäre PD-L1 Expression wieder leicht an. In der darauffolgenden Computertomografischen Kontrolle zeigte sich die Tumorgroße konstant.

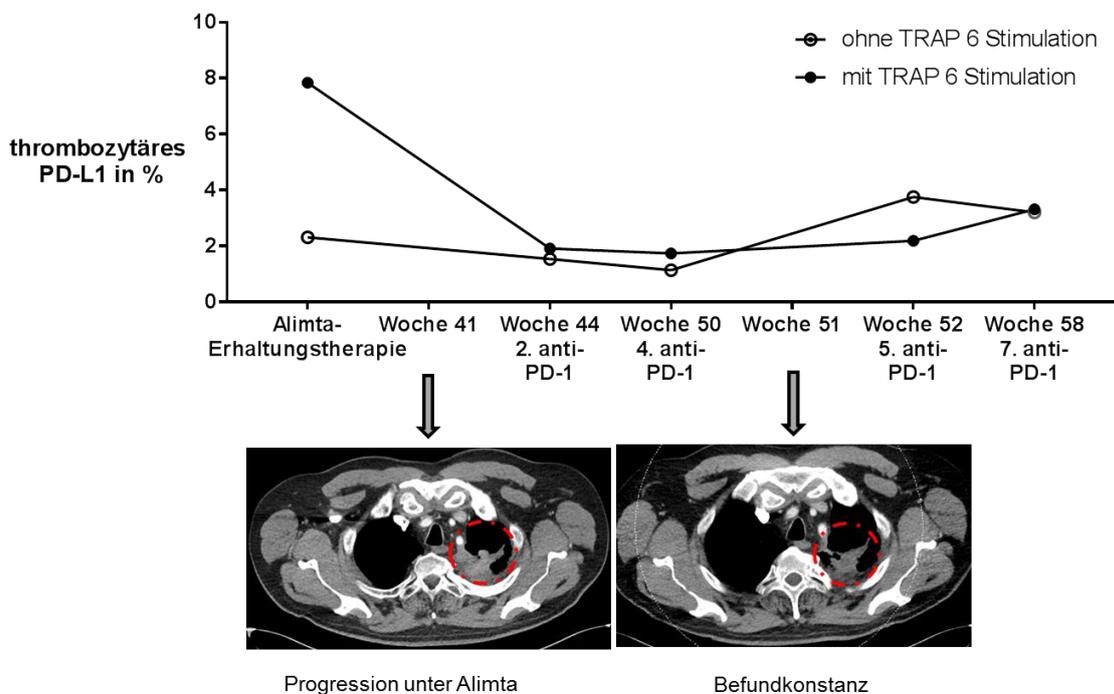


Abbildung 13: Beobachtung der thrombozytären PD-L1 Expression vor und unter anti-PD-1 (Pembrolizumab)- Therapie im Vergleich sind CT-Bilder aus den jeweiligen Untersuchungen dargestellt.

#### 4.4. Korrelationen mit erhobenen Parametern

##### 4.4.1. Korrelation mit Geschlecht, Histologie und UICC Stadium

Im Folgenden wurde die Analyse der thrombozytären PD-L1 Expression nach verschiedenen Parametern dargestellt, um eine mögliche Abhängigkeit von diesen Parametern zeigen zu können. Dargestellt wurde jeweils das thrombozytäre PD-L1 der nicht stimulierten Probe aufgeteilt nach den jeweilig erhobenen Parametern.

Es wurde geschlechterspezifisch die thrombozytäre PD-L1 Expression untersucht (Abbildung 14). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern detektiert werden (t-Test Männer vs. Frauen  $p=0,48$ ; Daten logarithmiert).

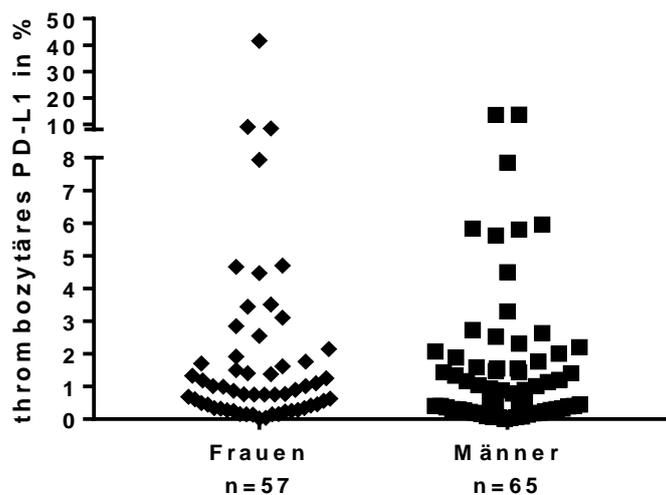


Abbildung 14: Thrombozytäres PD-L1 im Vergleich der beiden Geschlechtern (t-test  $p=0,48$ )

Im Vergleich der unterschiedlichen Altersstufen (Abbildung 15) konnte keine Korrelation der PD-L1 Expression auf Thrombozyten detektiert werden (ANOVA,  $p=0,953$ , logarithmiert).



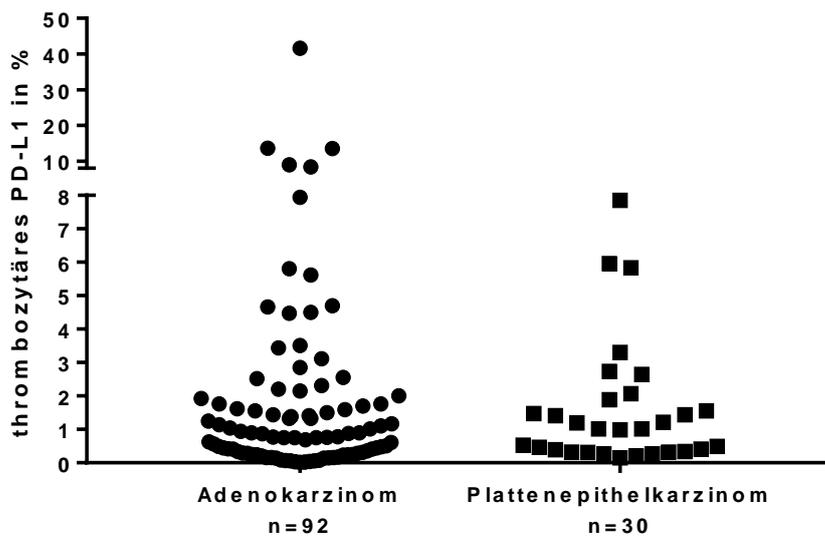


Abbildung 16: Vergleich des thrombozytären PD-L1 Expression der beiden Histologischen Subtypen ( t-Test:  $p=0,491$ )

Zudem wurde anhand des Raucherstatus untersucht, inwiefern das thrombozytäre PD-L1 mit Nikotinkonsum zusammenhängen könnte (Abbildung 17). Patienten mit unklarem Raucherstatus wurden von der Analyse ausgeschlossen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppen mit Nikotinkonsum und ohne Nikotinkonsum in der Anamnese (t-Test für 2 unabhängige Stichproben  $p=0,79$ ; Daten logarithmiert).

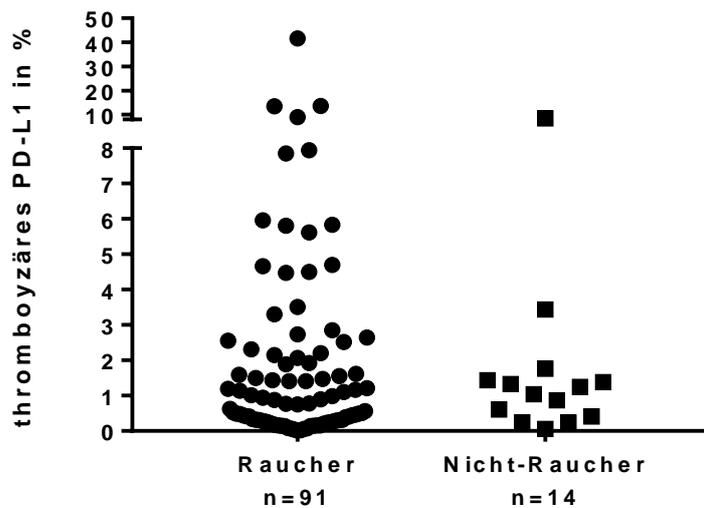


Abbildung 17: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression bezugnehmend auf die Raucheranamnese (t-test:  $p=0,79$ )

In dieser Studie nahmen auch Patienten in einem nicht-metastasiertem Stadium teil, weshalb in einer weiteren Analyse die Abhängigkeit der PD-L1 Expression von verschiedenen UICC-Stadien untersucht wurde (Abbildung 18). Patienten in einem nicht metastasierten Stadium zeigten im Median eine 0,94 % PD-L1 Expression auf Thrombozyten, wohingegen Patienten im metastasierten Stadium eine PD-L1 Expression von 0,87 % zeigten (t-test  $p=0,7$ ; Daten logarithmiert).

Mit dieser Analyse konnte eine vom UICC-Stadium der Patienten unabhängige thrombozytäre PD-L1 Expression gezeigt werden.

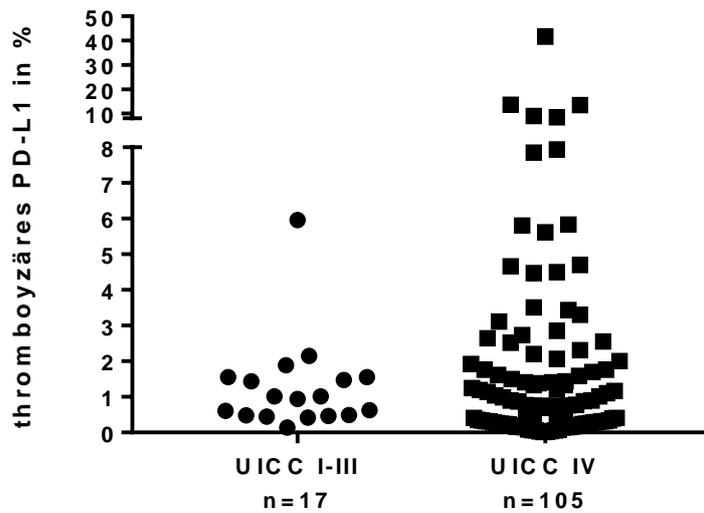


Abbildung 18: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression der UICC-Stadien (t-Test  $p=0,7$ )

Da die Patienten in unterschiedlichen Stadien der Therapie abgenommen wurden, wurde untersucht, ob sich die thrombozytäre PD-L1 Expression bei den verschiedenen Therapielinien unterscheidet (Abbildung 19). Hierbei zeigte sich, dass sich die thrombozytäre PD-L1 Expression nicht anhand der Therapielinien unterscheiden ließ (ANOVA  $p=0,127$ ; Daten logarithmiert).



4.) Zudem wurde ein Patient, der an einer doppelverblindeten Studie teilnahm, ausgeschlossen, da bis zum Niederschreiben der Arbeit nicht bekannt war, ob er einen anti-PD-1- Antikörper bekommen hat.

Im Vergleich der oben genannten Gruppen mit den Kontrollpatienten zeigte sich, dass sowohl Patienten ohne Immuntherapie als auch Patienten mit anti-PD-1 Antikörper signifikant mehr PD-L1 auf Thrombozyten exprimierten (Abbildung 20) (ANOVA, Tukey-Test:  $p < 0,001$ ; Daten logarithmiert). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die den gegen PD-L1 gerichteten Antikörper Atezolizumab infundiert bekamen, im Vergleich zu anderen Therapieregimen signifikant weniger thrombozytäres PD-L1 detektiert werden konnte (ANOVA, Tukey-Test: anti-PD-L1-Antikörper vs. anti-PD-1-Antikörper  $p < 0,001$ , anti-PD-L1-Antikörper vs. keine Immuntherapie  $p < 0,001$ ; Daten logarithmiert). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnte eine signifikant geringere PD-L1 Expression der Thrombozyten nach Gabe eines anti-PD-L1 Antikörpers detektiert werden (ANOVA, Tukey-Test  $p = 0,0003$ ; Daten logarithmiert). Im Vergleich zu Patienten, die keinen Checkpointinhibitor vor der Blutentnahme im Rahmen dieser Studie infundiert bekamen, zeigten Patienten, die einen anti-PD-1 Inhibitor infundiert bekommen haben, eine signifikant geringere PD-L1 Expression (ANOVA, Tukey-Test:  $p = 0,045$ ; Daten logarithmiert).

Somit konnte gezeigt werden, dass Immuntherapeutika einen Einfluss auf die thrombozytäre PD-L1 Expression haben.

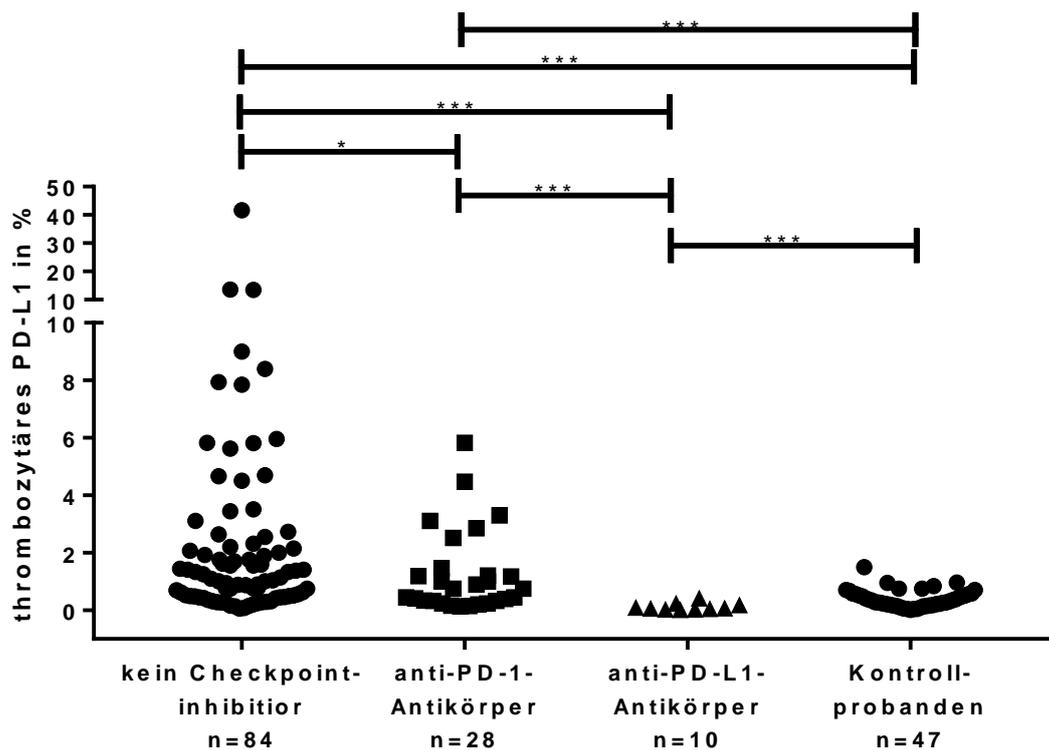


Abbildung 20: Vergleich der verschiedenen Therapieregimen der Untergruppen „keine Immuntherapie“, anti-PD-1-Therapie, der anti-PD-L1- Therapie, im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten (ANOVA, Tukey-Test: kein Checkpointinhibitor vs. Kontrollen  $p < 0,001$ , anti-PD-1-Antikörper vs. Kontrollen  $p < 0,001$ , kein Checkpointinhibitor vs. anti-PD-1:  $p = 0,045$ , anti-PD-L1-Antikörper vs. kein Checkpointinhibitor  $p < 0,001$ ; anti-PD-L1-Antikörper vs. anti-PD-1-Antikörper  $p < 0,001$ ; anti-PD-L1-Antikörper vs. Kontrollprobanden  $p < 0,001$ )

#### 4.4.3. Vergleich thrombozytäres PD-L1 mit Laborparametern

Aufgrund der bekannten Interaktionen der Thrombozyten mit anderen Blutzellen wurde untersucht, ob zwischen der thrombozytäre PD-L1 Expression und anderen Blutbildparametern ein Zusammenhang besteht. Dazu wurde die PD-L1 Expression von Thrombozyten mit dem C-reaktivem Protein, der Leukozytenzahl, der Lymphozytenzahl und Laktatdehydrogenase korreliert.

Da das Immuncheckpointprotein PD-L1 auch bei entzündlichen Prozessen eine relevante Rolle spielt [123], wurde außerdem untersucht, inwiefern thrombozytäres PD-L1 mit dem Entzündungswert C-reaktives Protein (CRP) korreliert (Abbildung 21). In der Zusammenschau der thrombozytären PD-L1 Expression und dem CRP wurde zur Überprüfung einer möglichen Korrelation der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho berechnet. Bei einer Stichprobe von 122 Patienten mit NSCLC konnte ein Korrelation von  $p=0,146$  detektiert werden. Damit konnte keine Korrelation zwischen thrombozytärem PD-L1 und CRP detektiert werden.

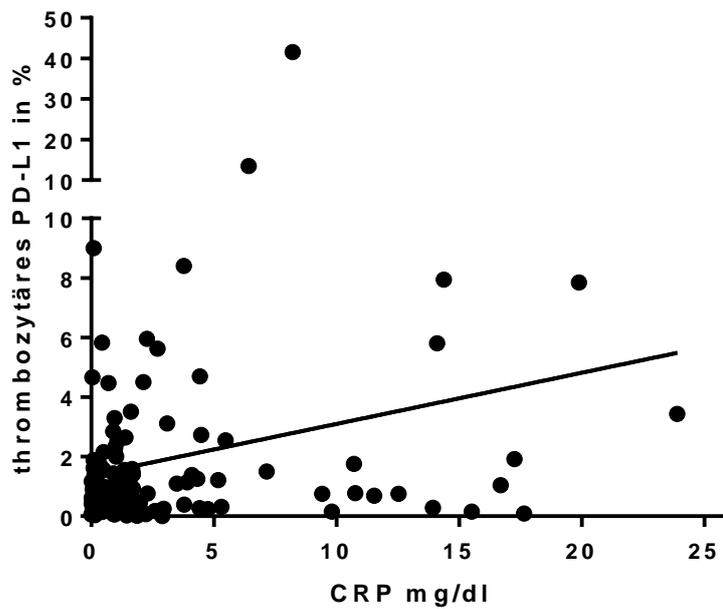


Abbildung 21: Korrelation des thrombozytären PD-L1 mit CRP in mg/dl (Spearman-Rho  $p=0,146$ )

Da Thrombozyten-Lymphozyten/Leukozyteninteraktionen bekannt worden sind [22] bzw. die PD-L1 Expression auf dem Tumor von der Lymphozyteninfiltration abhängig zu sein scheint [95], wurde zunächst die thrombozytäre PD-L1 Expression darauf untersucht, inwiefern sie mit der Lymphozytenzahl oder der Leukozytenzahl im Blut korreliert.

In Zusammenschau der thrombozytären PD-L1 Expression und der Leukozytenanzahl (Abbildung 22) konnte kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern detektiert werden (Spearman-Rho  $p=0,069$ ).

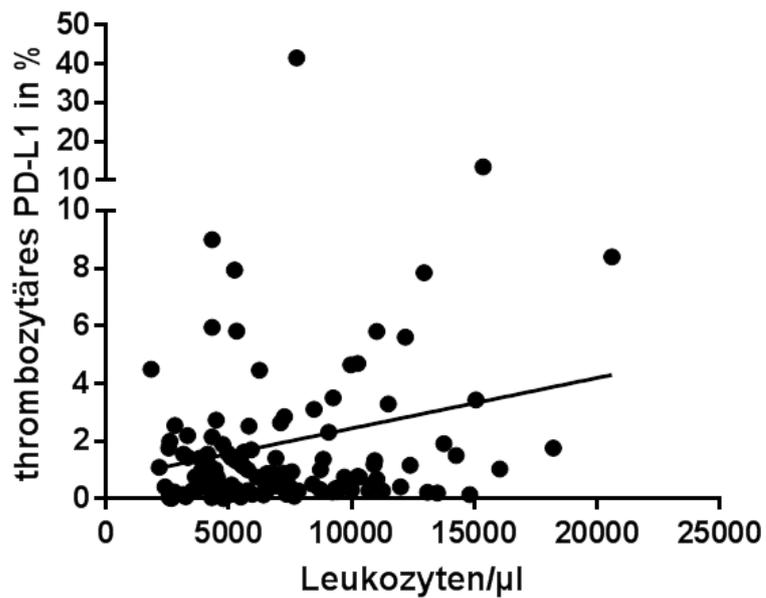


Abbildung 22: Korrelation der Leukozytenzahl mit thrombozytärem PD-L1 (Spearman-Rho  $p=0,069$ )

In Zusammenschau der Lymphozytenanzahl und der thrombozytären PD-L1 Expression (Abbildung 23) konnte keine Korrelation zwischen PD-L1 und Lymphozytenanzahl im Blut festgestellt werden (Spearman  $p=0,588$ ).

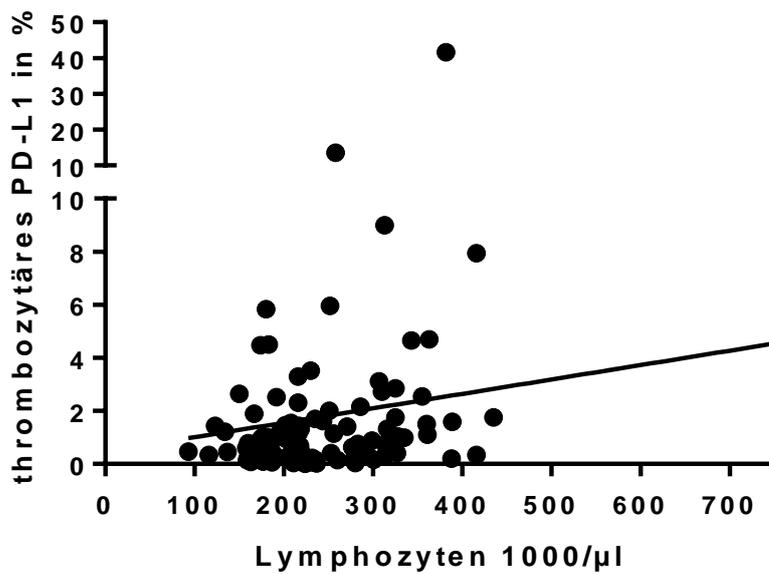


Abbildung 23: Korrelation der Lymphozytenzahl mit der thrombozytären PD-L1 Expression (Spearman-Rho  $p=0,588$ )

Da die Laktatdehydrogenase ein unspezifischer Marker für Tumorerkrankungen darstellt, wurden die Laktatdehydrogenaseaktivität und die Expression von PD-L1 auf einen Zusammenhang untersucht (Abbildung 24). Dabei zeigte sich, dass die Parameter signifikant miteinander zusammenhängen ( $p=0,017$ ). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wies eine Korrelation von 0,23 nach und damit einen schwachen positiven Zusammenhang zwischen LDH-Aktivität und thrombozytärem PD-L1.

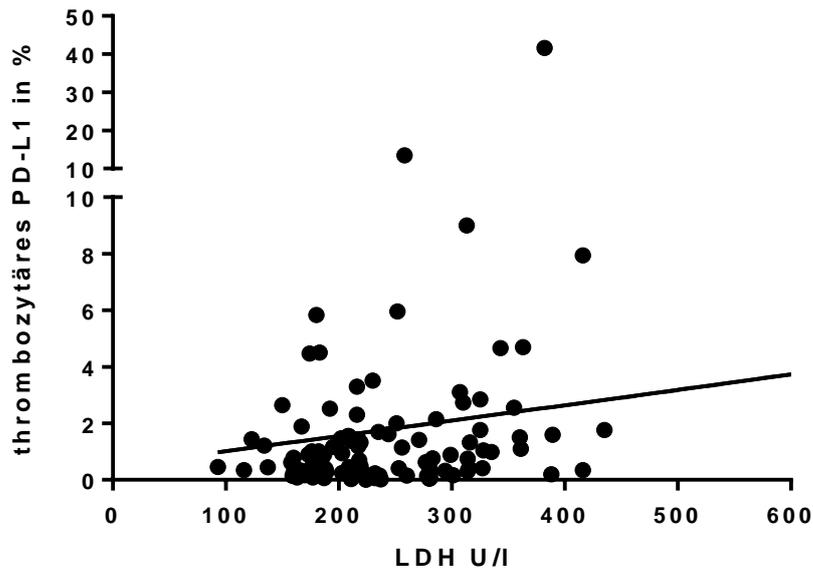


Abbildung 24: Korrelation der Laktatdehydrogenase mit thrombozytärem PD-L1 (Spearman-Rho:  $p=0,017$ ; Korrelationskoeffizient 0,23)

Da Thrombozyten Zielobjekte von verschiedenen Medikamenten sind, wurde auch untersucht, inwiefern die thrombozytäre PD-L1 Expression von einer Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers (Clopidogrel oder Aspirin) abhängig ist (Abbildung 25). Bei dem Vergleich der beiden Subgruppen zeigte sich, dass die Einnahme eines Thrombozytenaggregationsinhibitors keinen Einfluss auf die PD-L1 Expression von Thrombozyten hat ( $p=0,638$ , Daten logarithmiert).

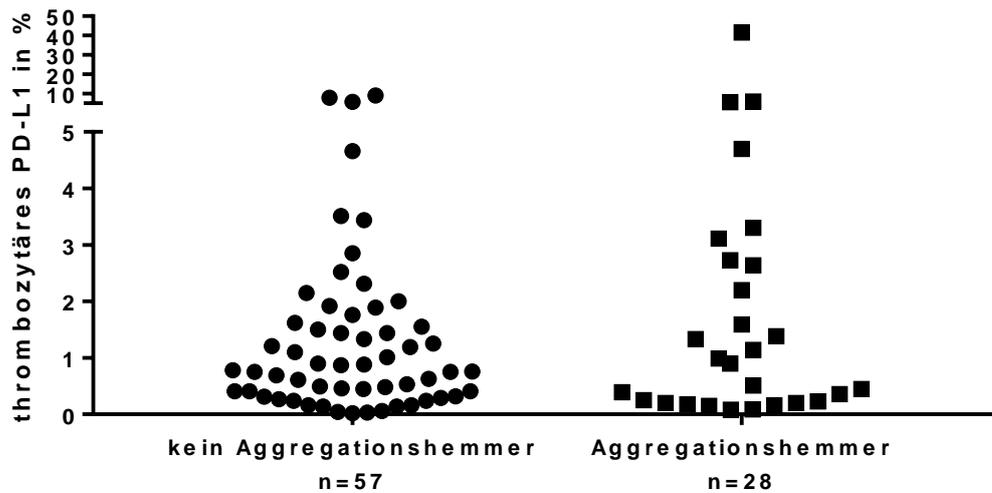


Abbildung 25: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression bezugnehmend auf die Einnahme von Thrombozyteninhibitoren (p=0,638)

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen thrombozytärem PD-L1 Expression und Mutationsstatus des Tumors detektieren zu können, wurde untersucht, ob Tumore mit einer KRAS Mutation (Abbildung 26) oder einer Mutation des EGFR-Gens (Abbildung 27) vermehrt PD-L1 auf den Thrombozyten exprimieren. Hierbei konnte kein Unterschied bezüglich der PD-L1 Expression auf Thrombozyten zwischen Wildtyp und Mutation sowohl bei EGFR als auch bei KRAS detektiert werden (t-test, unabhängige Stichproben EGFR-mutiert vs. WT: p=0,446; KRAS-mutiert vs. WT: p=0,456; Daten logarithmiert).



#### 4.5. PD-L1-Tumoranalyse im Vergleich zu thrombozytärem PD-L1

Im Folgenden wurde die PD-L1 Expression des Tumors in Zusammenschau der thrombozytären PD-L1 Expression untersucht, um herausfinden zu können, ob thrombozytäres PD-L1 die PD-L1 Expression des Tumors widerspiegelt und damit ein prädiktiver Faktor für eine positive Immunhistologie des Tumors sein könnte. Dazu wurden bereits vorhandene Biopsien durch die Pathologie des Universitätsklinikum Tübingen mittels des Klons Dako 28-8 gefärbt. Patienten, bei denen keine quantitative PD-L1 Bestimmung durch die Pathologie erfolgte, wurden von dieser Analyse ausgeschlossen. Die Patienten, bei denen eine quantitative PD-L1 Bestimmung durch die Pathologie erfolgte, wurden in 3 Gruppen eingeteilt:

- 1.) keine PD-L1 Expression auf dem Tumor
- 2.) 1-30 % PD-L1 Expression auf dem Tumor
- 3.) 30-90 % PD-L1 Expression auf dem Tumor

Die PD-L1 Expression der Thrombozyten scheint dabei unabhängig von der immunhistologisch bestimmten PD-L1 Expression des Tumors zu sein (Abbildung 28). Patienten ohne immunhistologisch bestimmbar PD-L1 Expression des Tumors zeigten eine ähnliche thrombozytäre PD-L1 Expression wie Patienten mit einer hohen PD-L1 Expression auf dem Tumor (ANOVA, Tukey: keine PD-L1 vs. 1-30 %  $p=0,179$ ; keine PD-L1 vs. 30-90 %:  $p=0,654$ ; 1-30 % vs. 30-90 %:  $p=0,859$ ; Daten logarithmiert).

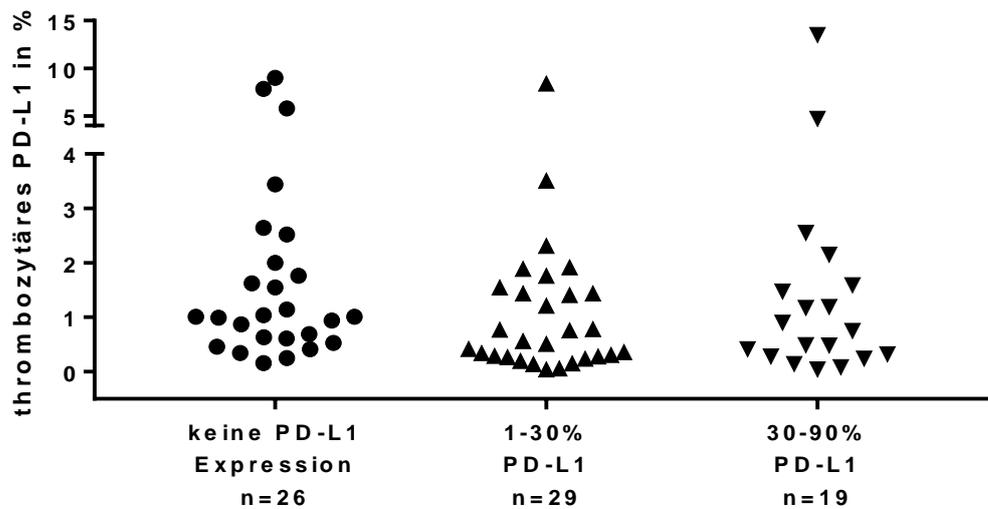


Abbildung 28: Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression mit der Immunhistologisch bestimmten PD-L1 Expression einer Biopsie des Primärtumors

#### 4.6. PD-L1 mRNA in Thrombozyten

Um zu klären, ob das Immuncheckpointmolekül PD-L1 von Thrombozyten synthetisiert werden kann, oder ob es durch die Muttermegakaryozyten präformiert in Thrombozyten vorliegt, wurden die Thrombozyten von sechs Patienten mit NSCLC und von fünf Kontrollpatienten auf deren Gehalt an PD-L1 codierende mRNA untersucht. Zunächst wurde hierbei aus dem plättchenreichen Plasma die Thrombozyten isoliert, anschließend aus diesen mRNA gewonnen, welche in cDNA umgeschrieben wurde und diese mittels quantitativer Real-time PCR auf eine mögliche PD-L1 Expression untersucht. Um zu prüfen, ob Patienten mit NSCLC generell mehr PD-L1 mRNA exprimieren als gesunde Kontrollen, wurden auch zwei Patienten mit niedriger PD-L1 Oberflächenexpression verwendet.

Durch die quantitative Realtime PCR konnte nachgewiesen werden, dass Thrombozyten mRNA für das Immuncheckpointmolekül PD-L1 enthalten (Abbildung 29). Diese Expression konnte sowohl in gesunden Kontrollen, als

auch in Patienten mit NSCLC gezeigt werden. Im Vergleich zu Tumorpatienten zeigten die gesunden Kontrollprobanden untereinander eine ähnliche PD-L1 Expression. Tumorpatienten zeigten eine sehr uneinheitliche PD-L1 Expression. Ein vermehrter Gehalt an PD-L1 mRNA von Tumorpatienten konnte nicht detektiert werden (Mann-Whitney-Test  $p=0,41$ ).

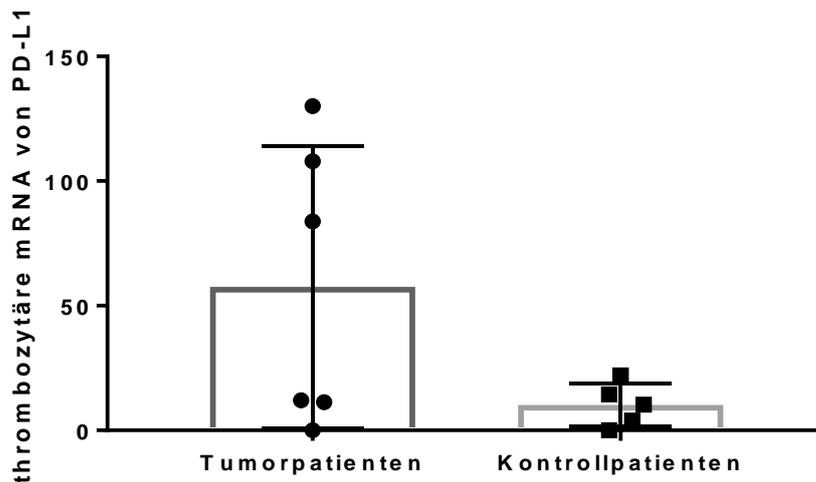


Abbildung 29: Vergleich der thrombozytären PD-L1 mRNA in Tumorpatienten und Kontrollpatienten

Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst der Mittelwert aller Kontrollen ermittelt und anschließend der Fold change aller Patienten aus diesem errechnet.

Bei Patienten, die eine hohe PD-L1 Expression in der Durchflusszytometrie aufwiesen, konnte eine höhere PD-L1 Expression auf der genetischen Ebene nachgewiesen werden. In einer Korrelationsanalyse zeigte sich (Abbildung 30), dass die PD-L1 Expression auf Thrombozyten signifikant mit dem Gehalt an mRNA Expression zusammenhängt (Spearman: unaktiviert vs. Foldchange mRNA  $p=0,03$  und aktiviert vs. Foldchange mRNA  $p<0,01$ ). Zudem konnte bei der Expression nach Stimulation ein höherer Korrelationskoeffizient detektiert werden 0,747 vs. 0,651 unaktiviert.

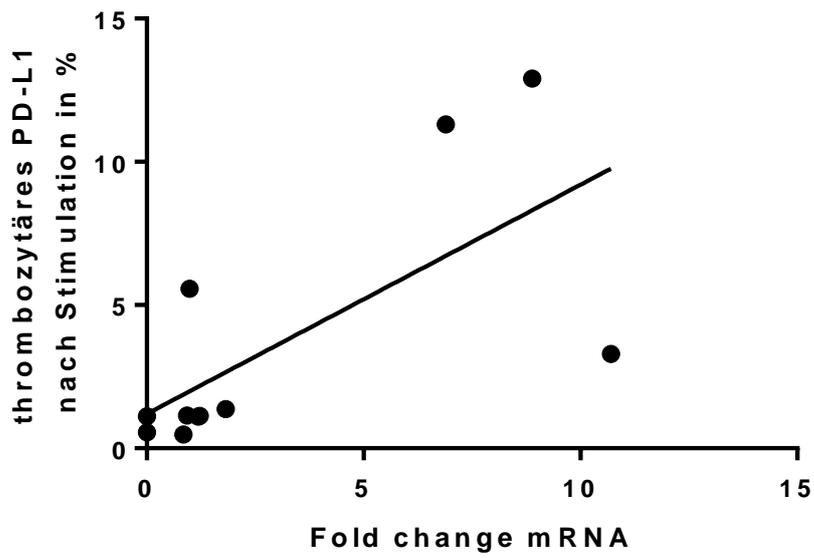


Abbildung 30: Korrelation der mRNA Expression von PD-L1 mit der PD-L1 Proteinexpression der durchflusszytometrischen Analyse ( $p < 0,01$  nach Spearman; Korrelationskoeffizient 0,747)

#### 4.7. Überlebensanalysen des Gesamtkollektivs

Um der Theorie nachzugehen, dass Patienten mit einer Progression des Tumors eine höhere PD-L1 Expression auf ihren Thrombozyten zeigen, wurden die Patienten anhand des progressionsfreien Überlebens in 2 Gruppen unterteilt. Dabei zeigte sich, dass Patienten, die innerhalb von 3 Monaten eine Progredienz der Tumorerkrankung zeigten, eine höhere PD-L1 Expression auf den Thrombozyten trugen (T-test  $p=0,007$ ; Daten logarithmiert). Damit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer frühen Progression der Grunderkrankung eine höhere PD-L1 Expression auf den Thrombozyten zeigten (Abbildung 31).

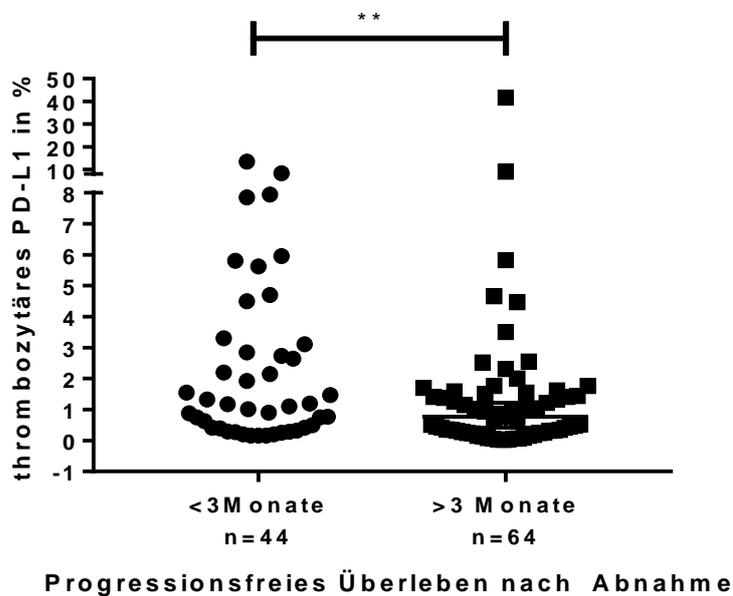


Abbildung 31: Vergleich des PFS unter 3 Monate und über 3 Monate (t-Test  $p=0,007$ )

Um eine mögliche Funktionalität als prognostischer Biomarker zu untersuchen, wurde das thrombozytäre PD-L1 mit dem Gesamtüberleben beziehungsweise mit dem Progressionsfreien Überleben korreliert. Um diese Analyse durchzuführen, wurden die Atezolizumab-Patienten aus der Berechnung genommen.

Um die Patienten in Gruppen aufzuteilen, wurde zunächst die Perzentilen der thrombozytären PD-L1 Expression des Gesamtkollektivs berechnet, um so die Patienten in 4 Gruppen einzuteilen:

- 1.) sehr wenig thrombozytäres PD-L1
- 2.) wenig thrombozytäres PD-L1
- 3.) viel thrombozytäres PD-L1
- 4.) sehr viel thrombozytäres PD-L1.

Tabelle 10: Perzentilenberechnung und Gruppeneinteilung nach den Perzentilen

	<b>% PD-L1</b>	<b>Patientenzahl</b>
<b>1. Perzentile „sehr wenig PD-L1“= Gruppe 1</b>	Bis 0,395	28 Patienten
<b>2. Perzentile „wenig PD-L1“= Gruppe 2</b>	Bis 1,010	30 Patienten
<b>3. Perzentile „viel PD-L1=Gruppe 3</b>	Bis 2,0525	26 Patienten
<b>Über der 3. Perzentile „sehr viel PD-L1“= Gruppe 4</b>	>2,0525	28 Patienten

Anschließend wurden diese Gruppen in einer Kaplan-Meier-Korrelation miteinander verglichen. Da Patienten unter dem PD-L1 Antikörper Atezolizumab eine sehr viel geringere PD-L1 Expression zeigten als gesunde Kontrollen, wurden diese Patienten aus der Analyse herausgenommen. Um einen möglichen Confounder auszuschließen, wurden die vier Gruppen auf verschiedene Charakteristika untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich der 4 Gruppen der thrombozytären PD-L1 Expression:  
Vergleich der Patientencharakteristika

	1. Perzentile N=28	2. Perzentile N=30	3. Perzentile N=26	4. Perzentile N=28	Signi- fikan- z
<b>Geschlecht</b>					ns
• Männer	16	12	11	13	
• Frauen	12	18	15	15	
<b>Alter (Median)</b>	67,5	64	65	66,5	ns
<b>Histologie</b>					ns
• Adeno- karzinom	19	23	19	21	
• Platten- epithel- karzinom	9	7	7	7	
<b>Therapielinie</b> (im Mittelwert)/ Median	1,8/2	1,55/1	1,28/1	1,5/1	ns

Da die meisten Patienten weder bei Erstdiagnose noch bei Therapieumstellung auf thrombozytäres PD-L1 untersucht wurden, wurde in den folgenden Kaplan-Meier-Korrelationen jeweils die Zeitabstände von Abnahme der Probe im Rahmen der Studie entweder bis zum Tod des Patienten und somit das Gesamtüberleben oder bis zur Progression des Tumors und somit das progressionsfreie Überleben verwendet.

Zunächst wurden die unterschiedlichen Gruppen auf Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten untersucht (Abbildung 32; Anhang-Abbildung 3). Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu allen anderen Gruppen vor allem die Gruppe mit einer thrombozytären PD-L1 Expression von über 2,05%

(sehr viel PD-L1 Expression) einen deutlichen Überlebensnachteil hat ((Log-Rank/Wilcox-Rank-Test) Gruppe 1 vs. Gruppe 4  $p=0,022$ ; Gruppe 2 vs. Gruppe 4  $p=0,034$ , Gruppe 3 vs. Gruppe 4  $p=0,005$ )).

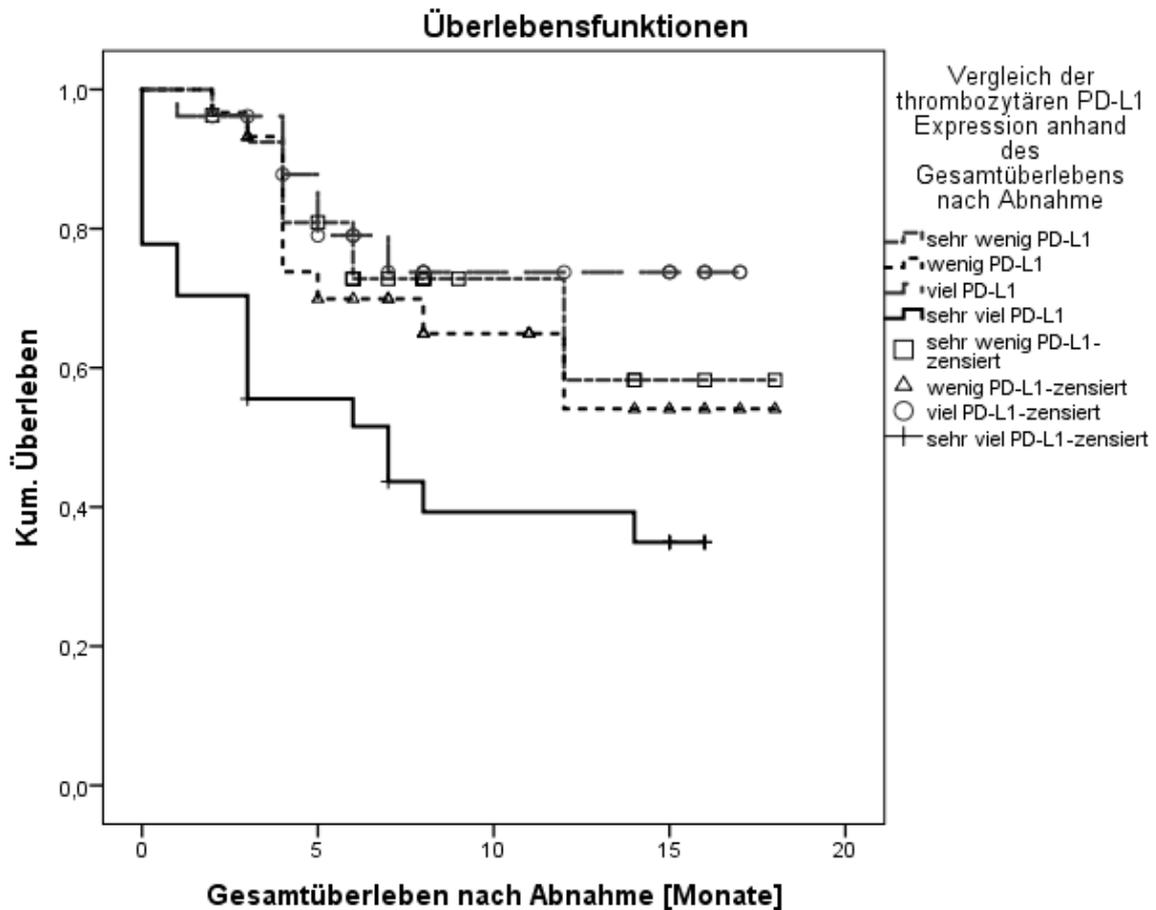


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve der 4 Subgruppen: „sehr wenig PD-L1“, „wenig PD-L1“, „viel PD-L1“ und „sehr viel PD-L1“. Im Vergleich zu allen anderen Subgruppen zeigen Patienten mit sehr viel PD-L1 ein signifikant schlechteres Überleben ((Log-Rank/Wilcox-Rank-Test) Gruppe 1 vs. Gruppe 4  $p=0,022$ ; Gruppe 2 vs. Gruppe 4  $p=0,034$ , Gruppe 3 vs. Gruppe 4  $p=0,005$ ).

Somit konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine sehr hohe thrombozytäre PD-L1 Expression zeigten, ein signifikant schlechteres Überleben im Vergleich zu Patienten zeigten, die wenig PD-L1 auf ihren Thrombozyten exprimierten.

Um eine Analyse des progressionsfreien Überlebens der Patienten nach Blutentnahme durchzuführen, wurden aus der Gruppe die Patienten ausgeschlossen, deren Blutentnahme unter einer adjuvanten Chemotherapie nach Operation erfolgte.

Bei der Analyse des progressionsfreien Überleben nach der Blutentnahme und somit Einschluss in diese Studie (Abbildung 33; Anhang-Abbildung 4), konnte beobachtet werden, dass Patienten, die sehr wenig PD-L1 auf ihren Thrombozyten exprimieren im Vergleich zu Patienten, die sehr viel PD-L1 auf ihren Thrombozyten exprimieren, ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben zeigten (Log-Rank: 1 vs. 4  $p=0,042$ ). Im Vergleich mit Patienten, die sehr viel PD-L1 auf ihren Thrombozyten exprimierten, zeigten Patienten mit wenig PD-L1 Expression keinen signifikanten Unterschied bezüglich des progressionsfreien Überlebens (Log-Rank 2 vs. 4  $p=0,07$ ). Im Vergleich der beiden Gruppen, die viel PD-L1 exprimierten zeigte sich, dass die Gruppe, die sehr viel PD-L1 exprimierte im Vergleich zu der Gruppe mit viel PD-L1 Expression einen Nachteil bezüglich des tumorfreien Überlebens aufwies (Log-Rank: 3 vs. 4  $p=0,039$ ).

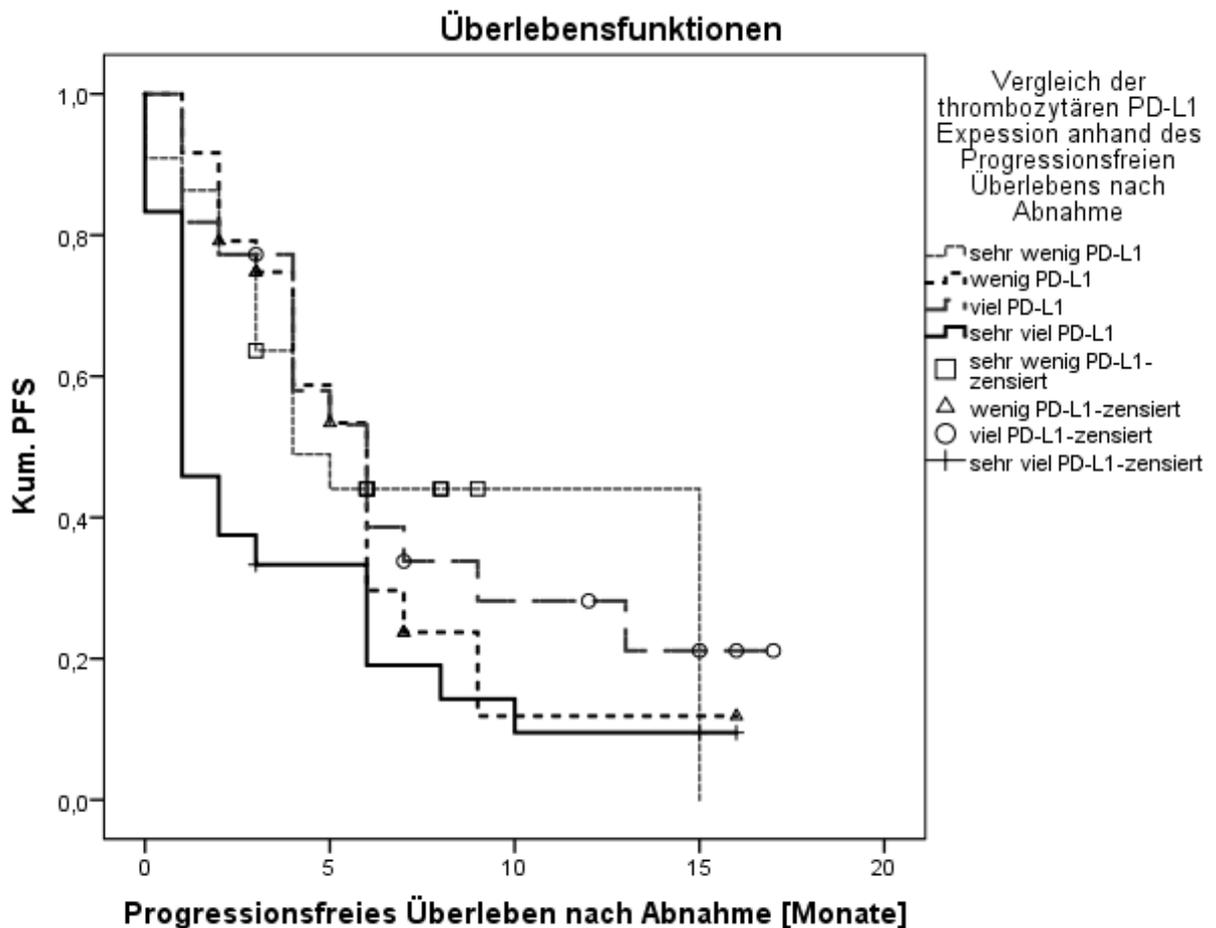


Abbildung 33: Progressionsfreies Überleben der Patienten in Bezugnahme auf deren thrombozytäre PD-L1 Expression (Log Rank 1 vs 4  $p=0,042$ ; 2 vs.4  $p=0,07$ ; 3 vs. 4  $p=0,039$ )

Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass Patienten, die sehr wenig PD-L1 auf ihren Thrombozyten exprimieren im Vergleich zu Patienten, die sehr viel PD-L1 exprimieren, ein längeres progressionsfreies Überleben und damit eine geringere Aggressivität des Tumors zeigten. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass Patienten, die viel PD-L1 exprimierten im Vergleich zu Patienten, die sehr viel PD-L1 exprimierten, einen leichten Überlebensvorteil hatten.

#### 4.8. Überlebensanalysen bei Patienten unter Immuncheckpointinhibitoren

Um zu analysieren, inwiefern die thrombozytäre PD-L1 Expression mit einem Ansprechen auf eine Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren korrelieren könnte, wurden die Patienten in die Gruppen "keine Immuntherapie" und „anti-PD-1- Therapie" unterteilt. Um Gruppen zu definieren, wurden, wie oben bereits beschrieben, unter Ausschluss der anderen Patientengruppen die Perzentile der Gruppen mit Immuncheckpointinhibitor berechnet und die Patienten anhand dieser in Gruppen eingeteilt.

Tabelle 12: Perzentilenberechnung und Gruppeneinteilung der Patienten, die unter einem anti-PD-1 Antikörper abgenommen wurden

	<b>% PD-L1</b>	<b>Patientenzahl</b>
<b>1.) Sehr wenig PD-L1</b> <b>Bis 1. Perzentile</b>	0,2475 %	n=7
<b>2.) Wenig PD-L1</b> <b>Zwischen 1. und 2. Perzentile</b>	0,58 %	n=7
<b>3.) Viel PD-L1</b> <b>Zwischen 2. und 3. Perzentile</b>	1,3825 %	n=7
<b>4.) Sehr viel PD-L1</b> <b>Über 3. Perzentile</b>	>1,3825 %	n=7

Anschließend wurden Kaplan-Meier-Analysen bezugnehmend auf progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patienten durchgeführt. Dabei wurden nur Patienten untersucht, die unter Therapie mit einem anti-PD-1 Antikörper in die Studie eingeschlossen wurden.

In Zusammenschau des progressionsfreien Überlebens der Patienten unter anti-PD-1 Antikörper stellte sich dar (Abbildung 34), dass keine signifikanten Unterschiede des progressionsfreien Überleben der Subgruppen gezeigt werden

konnte. Es fiel auf, dass vor allem Patienten zwischen der 2. und 3. Perzentile eine schlechtes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu den anderen Patientengruppen zeigten (LogRank-Test: 2 vs. 4  $p=0,86$ ; 1 vs. 4  $p=0,969$ ; 3 vs. 4  $p=0,064$ ; 2 vs. 3  $p=0,057$ ; 1 vs. 3  $p=0,107$ ; 1 vs. 2  $p=0,647$ ).

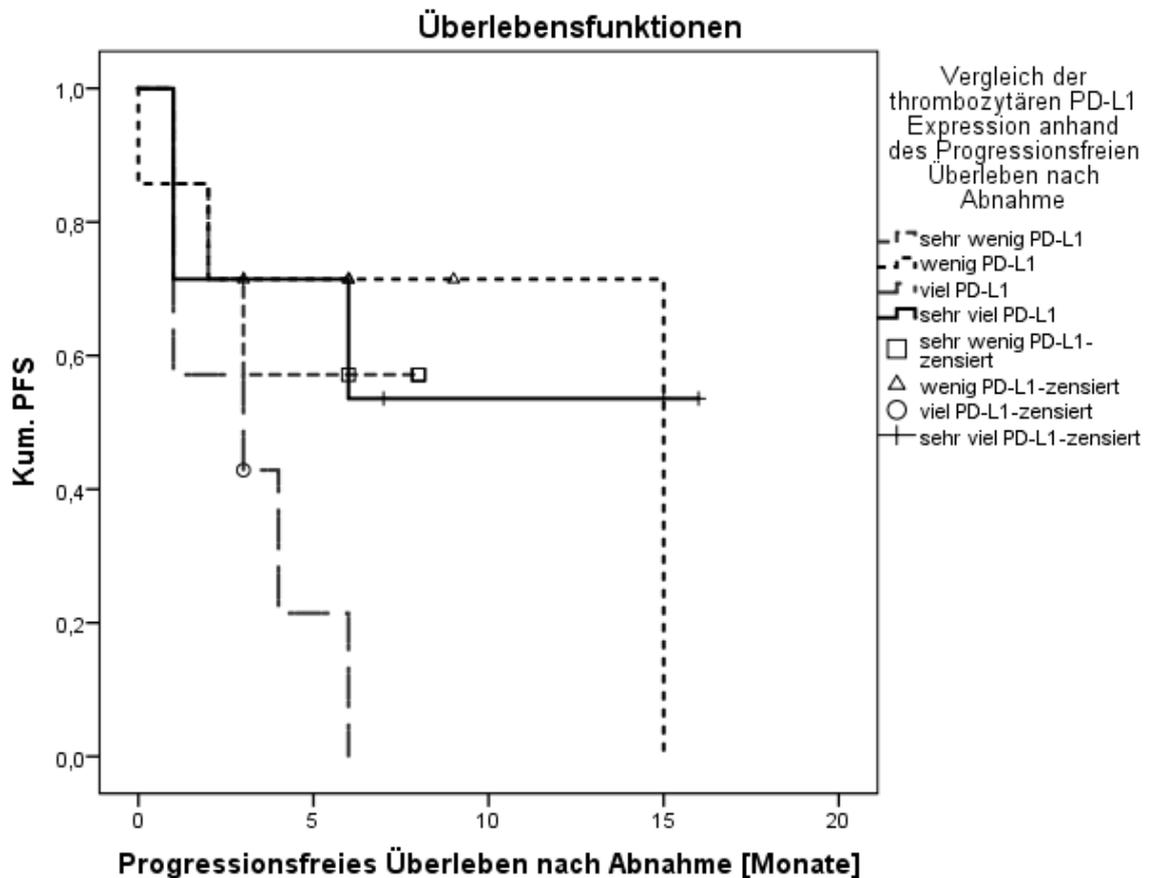


Abbildung 34: Progressionsfreies Überleben der Patienten unter anti-PD-1 Antikörper im Vergleich (2 vs. 4  $p=0,863$ , 1 vs. 4  $p=0,969$ ; 3 vs. 4  $p=0,064$ ; 2 vs. 3  $p=0,057$ ; 1 vs. 3  $p=0,107$ ; 1 vs. 2  $p=0,647$ )

Um zeigen zu können, ob eine PD-L1 Expression einen Überlebensvorteil unter einer Checkpointinhibitortherapie bringt, wurde im Folgenden eine Kaplan-Meier-Analyse der vier Gruppen berechnet (Abbildung 35). In Zusammenschau der Ergebnisse, unterscheiden sich die Kurven der unterschiedlichen PD-L1 Expressionen nicht wesentlich voneinander (LogRank:

2 vs. 4  $p=0,909$ ; 1 vs. 4  $p= 0,914$ ; 3 vs. 4  $p=0,953$ ; 2 vs. 3  $p=0,931$ ; 1 vs. 3  $p=0,924$ ; 1 vs. 2  $p= 0,857$ ).

Damit konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben der Patienten unter Immuntherapie nicht mit der PD-L1 Expression der Thrombozyten assoziiert ist.

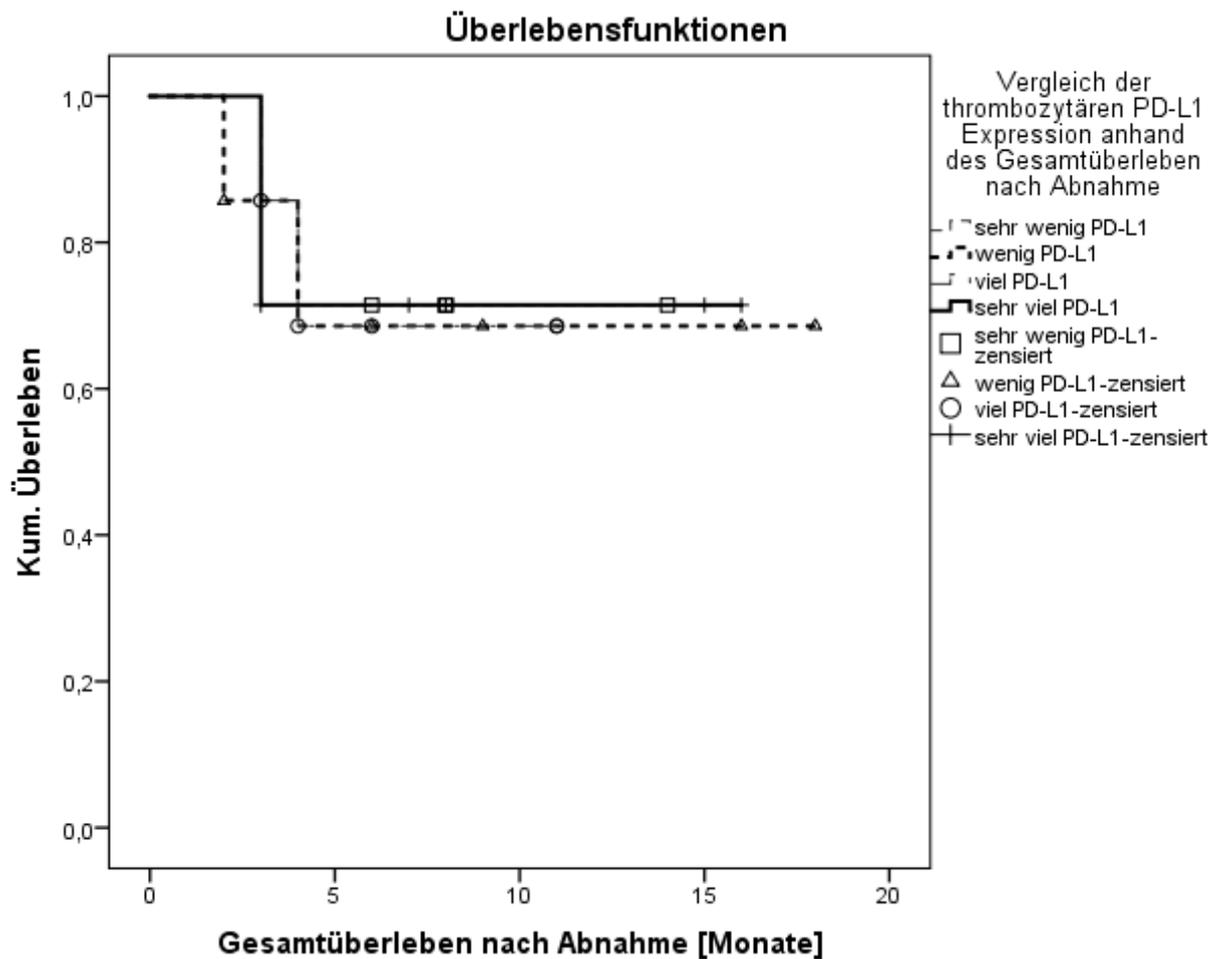


Abbildung 35: Gesamtüberleben der Patienten unter anti-PD-1 Therapie im Vergleich bezugnehmend auf deren thrombozytären PD-L1 Status (LogRank: 2 vs. 4  $p=0,909$ ; 1 vs. 4  $p= 0,914$ ; 3 vs. 4  $p=0,953$ ; 2 vs. 3  $p=0,931$ ; 1 vs. 3  $p=0,924$ ; 1 vs. 2  $p= 0,857$ ).

## 5. Diskussion

Die Intention dieser Dissertation bestand darin, einen neuen Biomarker für Patienten mit NSCLC unter Immuntherapie zu finden. Im Mittelpunkt stand die Untersuchung der thrombozytären PD-L1 Expression von Patienten mit NSCLC in Bezug auf Funktionalität als Biomarker, Herkunft und Regulation. Thrombozytäres PD-L1 wurde bisher nur auf gesunden Kontrollen als auch in Patienten mit NSCLC, Kopf-Hals-Tumoren und myeloproliferativen Erkrankungen beschrieben [124–126]. Die Regulation von PD-L1 auf Thrombozyten ist weitgehend unerforscht. Eine vermehrte Expression von PD-L1 auf Thrombozyten konnte bisher nur bei einer Mutation des JAK2V16F-Allels, sowie bei Rauchern nachgewiesen werden [124, 126]. Bedingt durch die Literaturlage wird deshalb in der folgenden Diskussion die thrombozytäre PD-L1 Expression vorwiegend mit der PD-L1 Regulation anderer Zellen verglichen.

### 5.1. Diskussion der Methodik

Aufgrund der geringen Größe der Thrombozyten musste bei der durchflusszytometrischen Analyse der Thrombozytenoberfläche auf eine geeignete Gating-Strategie zurückgegriffen werden. Dies wurde mittels der Differenzierung der Thrombozyten anhand der Größe und Granularität im FSC/SSC-Diagramm und der thrombozytenspezifischen CD41a-Expression erreicht. Eine Kontamination mit Thrombozyten – Leukozytenpartikel - Konglomeraten oder mit Thrombozyten - Tumorpartikel - Konglomeraten konnte damit minimiert, aber nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Limitation dieser Studie ist der Einsatz des Klons MIH1. In den meisten Studien werden andere Antikörper wie beispielsweise der Antikörper der Firma DAKO, Klon 28-8 oder der Firma Ventana, Klon SP142 verwendet. Inwiefern eine Färbung von PD-L1 mittels des Klons MIH1 der Färbung von 28-8 gleichkommt, ist nicht bekannt. Bekannt ist jedoch, dass der Klon 28-8 mehr PD-L1 färbt als SP142 [127]. Insofern war es schwierig, das Ergebnis aus dieser Dissertation mit

anderen Studienergebnissen zu vergleichen. Auch der Vergleich der PD-L1 Expression zwischen Tumor und Thrombozyt wurde ebenso limitiert (5.5.1). In weiterführenden Studien sollte die PD-L1 Expression auf Thrombozyten durch verschiedene Antikörper verglichen werden, um ein abschließendes Resultat über die beste Spezifität und Sensitivität der Antikörper bezüglich pPD-L1 ziehen zu können.

Da Thrombozyten sehr wenig mRNA enthalten und bei der hier angewendeten Purifikation von plättchenreichem Plasma eine mögliche Kontamination mit kernhaltigen Zellen nicht auszuschließen ist, sollten die hier dargestellten Ergebnisse im Rahmen einer weiterführenden Untersuchung verifiziert werden. Zudem war die Studienpopulation sehr klein, weshalb in weiterführenden Studien eine größere Studienpopulation, sowie eine zusätzliche Methode zur Purifikation der Thrombozyten eingesetzt werden sollte.

## 5.2. Patientenkollektiv

Das gesammelte Patientenkollektiv bestand aus Patienten mit NSCLC, die in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen eines Therapiezyklus oder weiterer Diagnostik der Erkrankung vorstellig wurden. Da das Patientenkollektiv dadurch sehr heterogen verteilt ist, sowohl bezugnehmend auf das Fortschreiten der Tumorerkrankung als auch der vorherigen Therapeutika und der aktuellen Medikation gestaltete es sich schwierig, Signifikanzen und Zusammenhänge zu detektieren.

Die „Kontrollprobanden“ waren sowohl Patienten, die in der Medizinischen Klinik Tübingen aus nicht-onkologischen Gründen vorstellig wurden und an keiner bekannten onkologischen Grunderkrankung erkrankt waren, als auch Ärzte und Mitarbeiter der Medizinischen Klinik Tübingen. Zwei Kontrollprobanden wurden dabei im Nachhinein aus der Analyse ausgeschlossen, da sich bei einem Probanden eine aktive Tumorerkrankung manifestierte und der andere klinisch und laborchemisch einen septischen Infekt entwickelte. Bei dem Patienten mit

septischem Infekt ist eine Hochregulation der Immuncheckpointmoleküle PD-L1 und PD-1 auf diversen Zellen bekannt [128].

Im Vergleich zu den Patienten mit NSCLC sind die Kontrollprobanden im Durchschnitt jünger (41 Jahre vs. 66 Jahre) und mehr Probanden weiblich. Ein möglicher Einfluss von Störgrößen wie Medikamenteneinnahmen, Nahrungsaufnahmen oder sportlicher Aktivität auf die thrombozytäre PD-L1 Expression kann nicht ausgeschlossen werden. In dieser Studienpopulation wurde nur die thrombozytäre PD-L1 Expression von nicht-onkologisch erkrankten Patienten mit Patienten, die an einem NSCLC leiden, verglichen. Eine vermehrte Expression von PD-L1 auf Thrombozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist bereits bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und Lungenkarzinomen bekannt [126].

In Nachfolgeuntersuchungen wird daher darauf zu achten sein, dass die beiden Kollektive einen ähnlichen Altersdurchschnitt haben sowie, dass sich die Patienten auf einem ähnlichen Stand der Erkrankung befinden und mögliche andere Störfaktoren, wie beispielsweise Medikamenteneinnahme in den beiden Gruppen vergleichbar sind.

### 5.3. Detektion von thrombozytärem PD-L1

#### 5.3.1. Thrombozytäres PD-L1 bei Kontrollprobanden und NSCLC-Patienten

Es konnte sowohl bei gesunden und nicht-onkologisch erkrankten Patienten, als auch bei Patienten mit NSCLC eine pPD-L1 Expression detektiert werden. Eine PD-L1 Expression auf Thrombozyten wurde nur auf gesunden Kontrollen und Thrombozyten von Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen sowie Kopf-Hals-Tumoren und einer Gruppe von vier Lungenkrebs-Patienten beschrieben [124, 126]. Zudem konnte auch eine Expression von sPD-L1 im Serum von gesunden Kontrollen detektiert werden [129].

Eine Expression auf Thrombozyten von Patienten mit NSCLC ist in einer großen Kohorte bisher nicht bekannt und konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden. Thrombozyten von Patienten mit NSCLC zeigten eine signifikant höhere PD-L1 Expression als die Thrombozyten von gesunden Kontrollprobanden (Abbildung 9).

Bei nicht-aktivierten Thrombozyten stellte sich die thrombozytäre PD-L1 Expression der Patienten mit NSCLC im Gegensatz zur Gruppe der gesunden Kontrollprobanden als sehr heterogen dar. Diese heterogene Verteilung der thrombozytären PD-L1 Expression bei Patienten wurde auch bei der PD-L1 Expression des Tumors beobachtet. So beschrieben Herbst et al., dass in ihrem Kollektiv an NSCLC-Patienten, knapp 66% der Patienten auf mindestens 1% der Tumorzellen PD-L1 exprimierten. Bei 28% der Patienten war sogar eine PD-L1 Expression von über 50% auf dem Primarius detektierbar [74]. Wodurch diese heterogene Expression von thrombozytärem PD-L1 zwischen den Patienten zustande kommen kann, ist nicht bekannt und ist Gegenstand späterer Diskussionsanteile (5.4.2; 5.5.1).

Da die meisten Thrombozyten bereits ohne Stimulation eine CD62P- Expression und damit eine Aktivierung zeigten (Abbildung 8), kann nicht auf eine konstitutive, aktivierungsunabhängige PD-L1 Expression von Thrombozyten geschlossen werden. Die Aussagen der PD-L1 Expression bezogen sich vielmehr auf verschiedene Aktivierungszustände der Thrombozyten. Die PD-L1 Expression wurde bei geringer Aktivierung mit einer PD-L1 Expression bei starker Aktivierung verglichen. Um ausschließen zu können, dass beispielsweise durch eine vermehrte Aktivierbarkeit der Thrombozyten von Tumorpatienten eine vermehrte PD-L1 Expression detektiert werden konnte, wurde sowohl die PD-L1 Expression als auch die Expression von CD62P mit den gesunden Kontrollen verglichen. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Thrombozyten der Tumorpatienten nur durch eine vermehrte Aktivierung, wie sie häufig bei Patienten mit maligner Grunderkrankung vorkommt [115], eine höhere PD-L1 Expression zeigten.

Die vorbestehende prä-Aktivierung der Thrombozyten kann in der Entnahme der Thrombozyten, als auch in einem „*malignen Phänotyp*“ der Thrombozyten begründet sein [115]. Dahingegen kann das unterschiedlich starke Ansprechen der Thrombozyten der Kontrollprobanden und der Tumorpatienten auf den Aktivierungsstimulus auf die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie Clopidogrel oder Aspirin zurückzuführen sein, die die Patienten aufgrund von kardiovaskulären Begleiterkrankungen einnahmen. Ein weiterer Faktor, der die Aktivierbarkeit der Thrombozyten herabgesetzt haben kann, kann die unvollständige Füllung der Citratröhrchen gewesen sein, wodurch das überschüssige Citrat eine adäquate Aktivierbarkeit der Thrombozyten verhinderte. Deshalb sollte in weiterführenden Studien mit größeren Studienpopulationen Patienten mit ähnlichen CD62P-Werten miteinander verglichen werden bzw. auf eine sorgfältige Blutentnahme mittels großer Nadel und optimalen Citrat-Plasma- Verhältnis geachtet werden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die pPD-L1 Expression durch eine Aktivierung der Thrombozyten mittels TRAP-6 reguliert werden kann. Bei Tumorpatienten steigt dabei der Anteil PD-L1 positiver Thrombozyten deutlich (Abbildung 10). Dies spricht für eine quantitativ signifikante Bedeutung von präformiertem PD-L1 in  $\alpha$ -Granula. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Beobachtung der Regulation von PD-L1 auf anderen Zellen: Eine Regulation der PD-L1 Expression durch Aktivierung ist auch auf T-Zellen bekannt [60]. Auf Tumorzellen kann die PD-L1 Expression mittels Stimulation durch Interferon- $\gamma$  reguliert werden [61].

Durch die Aktivierung der Thrombozyten stieg sowohl die Expression von CD62P als auch von PD-L1 auf der Thrombozytenmembran an. Damit liegt die Vermutung nahe, dass ähnlich wie CD62P, PD-L1 präformiert in den  $\alpha$ -Granula von ruhenden Thrombozyten vorliegt und durch Aktivierung in die Thrombozytenmembran integriert wird.

In vivo könnte diese Koexpression von CD62P und PD-L1 eine wichtige regulatorische Rolle bei Leukozyten-Thrombozyteninteraktionen übernehmen.

Es ist bereits bekannt, dass CD62P, welches durch Aktivierung der Thrombozyten vermehrt auf dessen Zellmembran präsentiert wird, der Bindungspartner von PSGL-1 ist, deren Interaktionen zu einer Bindung von Thrombozyten an Leukozyten sorgen kann [130]. Mittels der Koexpression von CD62P und PD-L1 könnte die PD-L1 Expression die Aktivität von Leukozyten limitieren. Da dies eine rein hypothetische Überlegung darstellt, sollte diese Hypothese mittels eines neuen Versuchsaufbaus getestet werden.

### 5.3.2. Langzeitbeobachtung der thrombozytären PD-L1 Expression

Bei der Langzeitbeobachtung der thrombozytären PD-L1 Expression konnte gezeigt werden, dass durch Therapie und Ansprechen auf eine Therapie die PD-L1 Expression auf Thrombozyten beeinflusst werden kann. Besonders beeindruckend war hierbei die Reduktion der thrombozytären PD-L1 Expression bei einer Patientin unter Pemetrexed. Eine Limitation dieser Beobachtung ist, dass zwischen den Blutentnahmen unterschiedlich viel Zeit vergangen ist, in welcher nicht klar ist, wie sich das thrombozytäre PD-L1 verhalten hat. Bei einem Patienten, der vor und unter Pembrolizumab abgenommen werden konnte, muss beachtet werden, dass zwischen Abnahme unter Erstlinie noch einige Zyklen der Chemotherapie erfolgten, in welcher nicht bekannt ist, inwiefern sich die PD-L1 Expression der Thrombozyten verändert hat. Geht man von der Annahme aus, dass die thrombozytäre PD-L1 Expression bei einem Progress der Tumorerkrankung steigt, muss man davon ausgehen, dass eventuell zwischen den beiden Abnahmen ein wichtiger Wert verpasst wurde und man deshalb nur von einem Wert, noch vor bekannter Progression, auf ein Ansprechen auf Pembrolizumab ausgehen kann.

Inwiefern man bei sinkender thrombozytärer PD-L1 Expression von einem Ansprechen auf Immuntherapie ausgehen kann, ist nicht bekannt. Beim NSCLC ist beschrieben, dass eine Reduktion der PD-L1 Expression auf dem Tumor unter Therapie mit einem Ansprechen auf diese Therapie korrelieren kann [131]. Auf Immunzellen ist eine solche Reduktion der PD-L1 Expression hingegen nicht

bekannt. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Expression auf Immunzellen durch Chemotherapie etwas ansteigt [131]. Besonders auf eine Therapie mit Paclitaxel und Tyrosinkinasehemmern reagierten die Tumorzellen mit einer Reduktion der PD-L1 Expression. Auf eine Therapie mit Pemetrexed blieb die PD-L1 Expression des Tumors allerdings konstant [131], wohingegen unsere Ergebnisse eine Reduktion der thrombozytären PD-L1 Expression unter Pemetrexed zeigen. In Zusammenschau der Daten fällt auf, dass bei der Aktivierung der Thrombozyten der zu Beginn chemo-naiven Patientin, es zu einer Reduktion von thrombozytärer PD-L1 Expression gekommen ist. Dies könnte jedoch auch als Artefakt beispielweise durch einen erhöhten Plättchenumsatz erklärt werden.

Da der Einfluss von Zytostatika auf Thrombozyten noch nicht untersucht ist, bleibt die Frage offen, wie Chemotherapeutika die PD-L1 Expression auf Thrombozyten regulieren könnten. Eine weitere Frage, die bei der Zusammenschau der Daten aufkommt, ist, welcher Parameter wohl besser für ein Monitoring einer Therapie genutzt werden könnte: Die PD-L1 Expression von aktivierten oder unaktivierten Thrombozyten? Diesen Fragestellungen sollte in weiterführenden Studien, in einem großen Patientenkollektiv mit regelmäßiger Blutentnahme nachgegangen werden.

#### 5.4. Korrelationen mit erhobenen Parametern

##### 5.4.1. Korrelation mit Geschlecht, Histologie und UICC-Stadium

Zur Klärung von Korrelationen zwischen der thrombozytären PD-L1 Expression und Parametern wie Alter, Geschlecht, Histopathologie, UICC-Stadium sowie Raucherstatus des Patienten, wurden diese Daten zusätzlich zu dem thrombozytären PD-L1 Status der Patienten erhoben. In Zusammenschau aller Daten konnte gezeigt werden, dass die PD-L1 Expression auf Thrombozyten unabhängig von Alter, Geschlecht oder dem Raucherstatus des Patienten war.

Diese Unabhängigkeit von PD-L1 in Bezug auf die oben genannten Parameter ist auch auf dem Primäris vorbeschrieben [131, 132]. Bei in Plasma gelöstem PD-L1 in NSCLC-Patienten konnte eine ähnliche unabhängige Expression von Parametern wie Geschlecht und Nikotinkonsum beschrieben werden [133]. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Azuma et al., die eine höhere PD-L1 Expression in resezierten NSCLC-Tumoren bei Frauen und bei Nicht-Rauchern, sowie bei Patienten mit Adenokarzinom zeigen konnten [134]. Im Gegensatz zu Azuma et al. konnte in der vorliegenden Arbeit weder ein signifikanter Unterschied bezüglich der PD-L1 Expression der Geschlechter noch des Raucherstatus ermittelt werden. Dies könnte darin begründet sein, dass unsere Studienpopulation, im Gegensatz zu der von Azuma et al. untersuchten Population, in einem fortgeschrittenen Tumorstadium war. Rolfes et al. konnten zeigen, dass auch bei gesunden Rauchern die pPD-L1 Expression im Gegensatz zu gesunden Kontrollen vermehrt ist [126]. Inwiefern unsere Kontrollpatienten Nikotin konsumieren ist nicht erhoben worden, wodurch ein möglicher Zusammenhang nicht detektiert werden konnte. Eine gemeinsame Limitation dieser Studien, unsere Studie miteingeschlossen, ist, dass die PD-L1 Expression nur bei Patienten einer Ethnie untersucht worden ist [135]. Inwiefern die Ethnie der Patienten bezüglich der PD-L1 Expression eine Rolle spielt und zwischen den Ethnien sich unterscheidet, ist bis heute nicht bekannt und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Im Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression von Plattenepithelkarzinomen zu Adenokarzinomen fiel auf, dass Plattenepithelkarzinome im Median eine höhere PD-L1 Expression auf Thrombozyten vorwiesen als Adenokarzinome. Dieser Unterschied stellte sich jedoch nicht als signifikant dar. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Konishi et al., Takada und D'Incecco, die diesen Trend zur erhöhten Expression von PD-L1 vermehrt bei Adenokarzinomen zeigen konnten [132, 136, 137]. Konishi et al. untersuchten bei Patienten mit resezierten NSCLC die PD-L1 Expression mittels des Klon MIH1 und konnten einen Trend zur vermehrten PD-L1 Expression bei Adenokarzinomen feststellen [132]. Im Vergleich zu unseren Analysen untersuchten Konishi et al. vor allem Japaner in

niedrigen UICC-Stadien, was wiederum die Diskrepanz zwischen den bereits publizierten Ergebnissen und den Ergebnissen unserer Analyse erklären könnte. Die italienische Arbeitsgruppe D’Incecco et al. untersuchten die PD-L1 Expression unter zu Hilfenahme des Klons 28-8 bei 125 Patienten mit NSCLC, wohingegen unsere Analysen mit dem Klon MIH1 durchgeführt wurden [136]. Cheng et al. konnten ebenso einen Unterschied zwischen Adenokarziomen und Plattenepithelkarzinomen hinsichtlich des PD-L1 Gehaltes im Plasma zeigen [133]. Somit bleibt unsicher, inwieweit man unsere Analysen mit den oben erwähnten Analysen vergleichen kann.

Im Gegensatz zur thrombozytären PD-L1 Expression oder Expression auf dem Tumor konnte bei der gelösten PD-L1 Form zudem eine Korrelation mit höheren UICC-Stadien nachgewiesen werden [133]. Im Vergleich zu unseren Analysen zeigte sich, dass die Patienten, die in unsere Studie eingeschlossen worden sind, viel älter sind, als die von Cheng et al. untersuchte Population. Da in unserer Analyse vor allem Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium eingeschlossen wurden, ist es schwierig eine Assoziation mit fortgeschrittenem Stadium zu detektieren, da vor allem Patienten in frühen Stadien fehlen. Für weitere Untersuchungen bezüglich der thrombozytären PD-L1 Expression und dessen Assoziationen ist es demnach von Vorteil, zu einer Analyse Patienten auch in unterschiedlichen UICC-Stadien einzuschließen.

#### 5.4.2. Therapievergleich: keine Immuntherapie vs. Immuntherapie

Da die Patienten unter verschiedenen, eventuell die PD-L1 Expression beeinflussende Therapeutika abgenommen wurden, wurde zunächst untersucht, inwiefern die PD-L1 Expression unter unterschiedlichen Therapielinien sich zueinander verhält. Da keine unterschiedliche PD-L1 Expression zwischen den Therapielinien gefunden werden konnte (Abbildung 19), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Gabe von Checkpointinhibitoren die PD-L1 Expression beeinflusst. Dazu wurden die Patienten in unterschiedliche Subgruppen unterteilt und anschließend die PD-L1 Expression untereinander, sowie mit den

Kontrollprobanden verglichen (Abbildung 20). Ähnlich wie bereits ohne eine solche Subgruppenanalyse stellte sich die PD-L1 Expression in der Gruppe „kein Checkpointinhibitor“ als sehr heterogen dar. Diese Heterogenität könnte von den unterschiedlichen Therapeutika induziert werden. Dabei konnte beispielsweise eine Reduktion der PD-L1 Expression durch Chemotherapeutika beim NSCLC gezeigt werden [131, 138], wohingegen bei Brustkrebszelllinien eine Steigerung der PD-L1 Expression durch Chemotherapeutika beschrieben ist [139]. Somit könnte die heterogene Verteilung der thrombozytären PD-L1 Expression durch eine Modulation mit bereits verabreichten Chemotherapeutika zustande kommen. Zudem kann die Heterogenität dieser Gruppe auch durch das heterogene Patientenkollektiv zustande kommen, welches sowohl erstdiagnostizierte Patienten als auch Patienten unter supportiven Maßnahmen enthält. In der Subgruppenanalyse konnte im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine signifikant höhere PD-L1 Expression detektiert werden.

Die Subgruppe, welche einen anti-PD-1-Antikörper zum Zeitpunkt der Abnahme verabreicht bekam, zeigte im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine signifikant höhere PD-L1 Expression. Im Vergleich zu den Patienten, die keinen Checkpointinhibitor verabreicht bekamen, zeigte sich eine signifikant geringere PD-L1 Expression der Thrombozyten. Dies wirft die Vermutung auf, dass durch eine Infusion mit PD-1 Inhibitoren die Expression von PD-L1 reguliert werden könnte. Eine solche Regulation des Bindungspartners bei anti-PD-1 ist bis heute nicht bekannt und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Da diese Regulation vor allem klinische Konsequenzen haben könnte und damit eventuell sogar ein Ansprechen vorhersagen könnte (vgl. 5.3.2.).

Der Klon MIH1, der in dieser und vielen weiteren Studien zur Detektion von PD-L1 verwendet wurde [72, 132], zeigte bei Patienten unter Gabe des Immuncheckpointinhibitors Atezolizumab eine signifikant geringere PD-L1 Expression im Vergleich zur Expression der Thrombozyten der anderen Subgruppen. Dies zeigte sich kohärent mit der Studie von Chatterjee et al. Diese benutzten den Klon MIH1 als Blockade für eine anti-PD-L1 Bindung durch Atezolizumab [140]. Die in der Durchflusszytometrie fehlende PD-L1 Detektion ist damit auf die sterische Hemmung des MIH1 auf Atezolizumab zurückzuführen.

Somit konnte der Färbeantikörper MIH1 nicht an PD-L1 binden und in der Durchflusszytometrie konnte keine PD-L1 Expression durch den Klon MIH1 detektiert werden. Damit lässt sich die signifikant reduzierte PD-L1 Expression auf Thrombozyten von Atezolizumab-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden als auch Patienten ohne Atezolizumab in der Anamnese erklären. Aufgrund dieses methodischen Fehlers wurden die Patienten unter und nach Atezolizumab-Gabe aus weiteren Analysen, wie progressionsfreies Überleben oder Gesamtüberleben herausgenommen. Trotzdem ist bei diesen Patienten von einer thrombozytären PD-L1 Expression auszugehen und müsste mit einem Antikörper gegen ein anderes Epitop des PD-L1-Proteins auch bei Gabe von Atezolizumab detektierbar sein. Dies müsste in weiteren Studien beispielsweise mit dem Klon Dako 28-8 untersucht werden.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass pPD-L1 eine Zielstruktur für Atezolizumab und andere therapeutische PD-L1-Antikörper darstellt. Aufgrund des hohen Umsatzes von Plättchen bei Tumorpatienten [141] stellt die Aufklärung dieses Phänomens eine relevante Beobachtung zur Pharmakokinetik von Atezolizumab dar: Thrombozytose könnte zur Atezolizumab-Resistenz beitragen, durch eine Konkurrenz mit Tumor-PD-L1 [126].

#### 5.4.3. Vergleich der thrombozytären PD-L1 Expression mit Laborparametern

Da Thrombozyten mit sehr vielen Zellen des Blutes interagieren [21], wurde in diesen Analysen untersucht, ob die thrombozytäre PD-L1 Expression mit anderen Blutparametern zusammenhängt.

In vitro Experimente zeigten, dass PD-L1 in verschiedenen Zellen durch Entzündungsmediatoren hochreguliert wird [52, 56]. Darum wurde die Expression von thrombozytärem PD-L1 auf eine Korrelation mit dem C-reaktiven Protein untersucht, um eine mögliche Regulation des thrombozytären PD-L1 durch Entzündung detektieren zu können. Im Rahmen dieser Dissertation konnte

gezeigt werden, dass das thrombozytäre PD-L1 nicht mit dem C-reaktiven Protein korreliert (Abbildung 21). Daraus lässt sich folgern, dass die thrombozytäre PD-L1 Expression unabhängig von Entzündungsparametern exprimiert wird. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen sowohl in vitro an Endothelzellen [56], als auch zu Untersuchungen von Matsubara et al., die eine Korrelation zwischen PD-L1 Expression auf den Tumorzellen von resezierten NSCLC-Patienten und präoperativen CRP-Levels zeigten [123]. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden dabei Patienten untersucht, deren Tumor reseziert worden war, und sich damit in einem weniger weit fortgeschrittenen Tumorstadium befanden als das hier untersuchte Kollektiv.

Bei Tumoren ist bekannt, dass eine erhöhte PD-L1 Expression in Biopsien mit einer vermehrten Lymphozyteninfiltration assoziiert ist [95]. Demnach wurde in einer weiteren Korrelationsanalyse untersucht, inwiefern die thrombozytäre PD-L1 Expression mit der Anzahl der Lymphozyten im Blut abhängt. Dabei konnte gezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen thrombozytärem PD-L1 und einer erhöhten Lymphozytenzahl besteht.

In Zusammenschau der thrombozytären PD-L1 Expression mit der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase zeigte sich, dass eine hohe Laktatdehydrogenase mit einer erhöhten PD-L1 Expression auf Thrombozyten assoziiert war. Kluger et al. konnten keine solche Korrelation zwischen PD-L1 auf Melanomen und der Enzymaktivität feststellen [142]. Diem et al. konnten zeigen, dass Patienten, die einen hohen LDH- Wert zu Beginn der Therapie aufwiesen, ein kürzeres Gesamtüberleben hatten [143]. Mit einer steigenden Enzymaktivität unter Therapie konnte zudem eine beginnende Progression der Erkrankung vorhergesagt werden [143]. Inwiefern die thrombozytäre PD-L1 Expression eine Progression der Erkrankung vorhersagen könnte, wird Gegenstand von späteren Diskussionsanteilen (5.6) sein.

Der Mutationsstatus des Tumors scheint eine wichtige Rolle für die Expression von PD-L1 auf Tumoren zu spielen [96]. Im Gegensatz dazu, konnten in unserer Analyse der PD-L1 Expression von Thrombozyten von Wildtyp KRAS und mutiertem KRAS im Tumor keine Unterschiede bezüglich PD-L1 Expression

detektiert werden. Auch eine mögliche Korrelation von thrombozytärem PD-L1 und EGFR- Mutation im Tumor konnte nicht gefunden werden. Dies konnte auch in anderen Studien beim NSCLC in Bezugnahme auf die PD-L1 Expression des Tumors gezeigt werden [144]. D’Incecco et al. hingegen konnten zeigen, dass die PD-L1 Expression bei NSCLC-Tumore durch eine Mutation im EGFR-Rezeptor erhöht ist [136]. Weitergehend konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz des EGFR-Inhibitors Erlotinib die PD-L1 Expression in diversen Zelllinien reduziert werden konnte, sowie PD-L1 bei EGFR-Mutation erhöht ist [134]. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen, die eine erhöhte PD-L1 Expression bei Wildtyp EGFR im Vergleich zu mutiertem EGFR detektieren konnten [123, 137]. Limitierend bleibt zu erwähnen, dass in den hier erwähnten Studien immer die Expression der mutierten Tumore mit der nicht-mutierten Tumore verglichen wird.

### 5.5. Herkunft des thrombozytären PD-L1

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten das Immuncheckpointmolekül PD-L1 exprimieren. Woher die thrombozytäre PD-L1 Expression stammt, blieb aber unklar. Deshalb wurde in zwei weiteren Analysen zwei von drei Theorien des Ursprungs von thrombozytären PD-L1 nachgegangen:

- 1.) Durch Tumor-Plättchen-Interaktionen oder Sekretion des Tumors, wie bereits bei diversen Zytokinen beschrieben [145], ist das PD-L1 des Tumors auf die Oberfläche des Thrombozyten übergegangen.
- 2.) Durch mRNA –Translation kann der Thrombozyt das Protein PD-L1 synthetisieren.
- 3.) Der Thrombozyt beinhaltet viele Proteine, die er von seinem Mutter-Megakaryozyten bekommt [146], unter anderem auch PD-L1.

Die Theorie, dass das Protein PD-L1 dabei von den Megakaryozyten den Thrombozyten mitgegeben werden könnte, wurde bei diesen Untersuchungen

vernachlässigt. Ein weiterer Aspekt, der bei diesen Überlegungen vernachlässigt worden ist, ist der mögliche Kontakt zwischen Megakaryozyten in der Lunge mit dem Tumorgewebe, solch ein Kontakt zwischen Lungengewebe und Megakaryozyten ist bereits einige Zeit bekannt [16].

#### 5.5.1. Tumor PD-L1 und thrombozytäres PD-L1

Um die Herkunft von thrombozytärem PD-L1 erklären zu können und die Heterogenität der interindividuellen PD-L1 Expression klären zu können, wurde die Hypothese untersucht, dass durch Thrombozyten-Tumorinteraktionen die PD-L1 Expression des Tumors auf den Thrombozyten übergeht. Ähnliches hatten bereits Placke et al. in gegenläufiger Richtung beschrieben [37]. Placke et al. konnten zeigen, dass nach Koinkubation von Tumorzellen mit Thrombozyten, Tumorzellen Proteine von Thrombozyten auf ihrer Oberfläche exprimierten [37].

In unserer Analyse der PD-L1 Expression des Tumors im Vergleich zu der thrombozytären PD-L1 Expression konnten keine signifikanten Unterschiede oder Zusammenhänge zwischen der PD-L1 Expression des Tumors und der thrombozytären PD-L1 Expression detektiert werden. Dies könnte darin begründet sein, dass bei den meisten Patienten keine Bestimmung der PD-L1 Expression auf einer Biopsie erfolgte und sie damit von dieser Untersuchung ausgeschlossen wurden und mögliche Zusammenhänge so nicht detektiert worden sind. Bei weiteren Untersuchungen wird deshalb eine Analyse der PD-L1 Expression des Tumors von Nöten sein. Eine weitere Schwierigkeit der Detektion eines Zusammenhangs zwischen thrombozytären PD-L1 und PD-L1 Expression des Primarius könnte an der Problematik der PD-L1 Detektion liegen. Zum einen wird für die Detektion von PD-L1 auf dem Tumor der Klon DAKO 28-8 verwendet, wohingegen die thrombozytäre PD-L1 Expression im Rahmen dieser Studie mit dem Klon MIH1 detektiert wurde. Dabei ist bekannt, dass die PD-L1 Expression auf dem Tumor abhängig ist vom verwendeten Assay [127, 147]. Zum anderen

wird diskutiert, dass die PD-L1 Bestimmung auf Biopsien meist nicht der PD-L1 Expression des Gesamttumors entspricht, da die PD-L1 Expression sehr heterogen auf dem Tumor verteilt zu sein scheint und im klinischen Alltag nur ein kleiner Teil des Tumors auf PD-L1 untersucht wird [96, 148]. So zeigen manche Tumore in der Biopsie eine viel geringere PD-L1 Expression, wie die PD-L1 Expression des Tumors als Ganzes: 48% Diskordanz [148]. Damit bleibt offen, inwiefern die thrombozytäre PD-L1 Expression von der PD-L1 Expression des Tumors abhängen könnte.

### 5.5.2. PD-L1 mRNA in Thrombozyten

Um klären zu können, woher das thrombozytäre PD-L1 stammen könnte, wurde aus Thrombozyten mRNA isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. Die durchgeführte mRNA Isolation und Real-Time PCR zeigte in Zusammenstellung mit den durchflusszytometrischen Daten einen Zusammenhang zwischen thrombozytärer PD-L1 Expression und Expression von PD-L1 mRNA. Dabei konnte sowohl bei gesunden Kontrollpatienten als auch bei Patienten mit NSCLC PD-L1 mRNA gefunden werden. Dies findet Bestätigung durch die Arbeit von Erber et al., die die PD-L1 Expression auf Tumorzellen von Biopsien von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mit der PD-L1 mRNA korrelieren konnten [149]. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen benutzten Erber et al. den Klon 28-8 zur Detektion von PD-L1 auf Tumorzellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis bei der Untersuchung der mRNA und der PD-L1 Expression auf Tumorzellen bei Patienten mit Ösophaguskarzinomen kommt die Arbeit von Ohigashi et al., bei dem bei Tumorzellen eine mRNA Korrelation mit der PD-L1 Expression gezeigt werden konnte [72]. Da sowohl in Thrombozyten von Tumorkontrollpatienten, als auch auf Thrombozyten von Kontrollprobanden eine PD-L1 mRNA Expression gezeigt werden konnte, kann anhand der mRNA nicht unterschieden werden, ob der Patient an einer Tumorerkrankung leidet oder gesund ist. Eine solche Klassifizierung anhand des unterschiedlichen Gehalts an

mRNA in Thrombozyten ist beispielsweise in Patienten mit Herzinfarkten beschrieben [150].

Die Herkunft der thrombozytären PD-L1 mRNA bleibt in diesem Experiment ungeklärt. Dabei könnten verschiedene Erklärungen hinzugezogen werden. Da bereits bekannt ist, dass Megakaryozyten auch von gesunden Spendern das Protein PD-L1 exprimieren [124, 126], könnte die mRNA Ausstattung des Thrombozyten von Megakaryozyten stammen. Diese mRNA Expression könnte durch externe Stimuli wie Aktivierung der Thrombozyten oder Entzündungsmediatoren beeinflusst werden [151]. Zum anderen könnte der Tumor die mRNA- Expression in Thrombozyten beeinflussen [152], indem der Thrombozyt, mRNA enthaltende Mikropartikel, die vom Tumor sezerniert wurden, aufnimmt [153]. Damit könnte die vermehrte mRNA PD-L1 Expression bei drei von sechs Tumorpatienten erklärt werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass bei Thrombozyten, die eine vermehrte PD-L1 Expression in der Durchflusszytometrie zeigten, auch eine höhere Expression von PD-L1 mRNA detektiert werden konnte. Trotzdem bleiben einige Theorien bezüglich der Herkunft von thrombozytärem PD-L1 offen.

## 5.6. Überlebensanalyse

### 5.6.1. Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs

Anhand des progressionsfreien Überleben nach Abnahme wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: in Patienten mit einem progressionsfreien Überleben über 3 Monate und Patienten, die eine Progression innerhalb von 3 Monaten zeigten. Bei dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass Patienten, deren Tumor innerhalb von 3 Monaten progredient wurde, eine vermehrte PD-L1 Expression auf den Thrombozyten zeigten. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurde auf Basis dieser Untersuchung Kaplan-Meier Analysen zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben der Patienten durchgeführt.

Die durchgeführte Überlebensanalyse nach dem Gesamtüberleben des Patienten demonstrierte, dass Patienten mit sehr ausgeprägter PD-L1 Expression auf den Thrombozyten im Vergleich zu allen anderen Patienten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben zeigten. Damit konnte demonstriert werden, dass eine PD-L1 Expression von über 2 % ein Prädiktor für ein schlechteres Überleben des Patienten darstellte. Einschränkend lässt sich zu dieser Analyse sagen, dass im Vergleich zu anderen Studien hier nicht das Gesamtüberleben des Patienten ab Erstdiagnose verwendet wurde, sondern vielmehr das Gesamtüberleben nach Studieneinschluss. Dies liegt daran, dass die Patienten zum einen nicht alle bei Erstdiagnose der Tumorerkrankung in die Studie eingeschlossen werden konnten und damit in unterschiedlichen Stadien ihrer Erkrankung in die Studie mitaufgenommen wurden. Damit könnte ein möglicher Confounder dieses Ergebnisses die unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte im Lauf der Erkrankung sein. Dies müsste in weiteren statistischen Untersuchungen überprüft werden, die aber aufgrund der geringen Patientenanzahl in dieser Studie nicht durchgeführt werden konnten. In künftigen Studien sollten die Patienten in einem bereits vorher definierten, ähnlichen Erkrankungsstadium analysiert werden, um einen möglichen Confounder wie den Abnahmezeitpunkt auszuschließen. Zudem wurde in dieser Kollektiv Patienten unter verschiedenen Chemotherapeutika gemeinsam, ohne eine Differenzierung dieser Therapeutika untersucht. Sodass ein möglicher Confounder, wie beispielsweise die Gabe eines Chemotherapeutikums oder die eines Immuncheckpointinhibitors die Ergebnisse dieser Analyse verzerren kann.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Zhao et al, die in Plasma gelöstes PD-L1 untersuchten. Bei in Plasma gelöstem PD-L1 bei Patienten mit NSCLC zeigte sich, dass Patienten mit niedriger PD-L1 Expression ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit höherer PD-L1 Expression im Plasma zeigten [154]. Zu dem Ergebnis, dass eine vermehrte PD-L1 Expression auf dem Tumor ein Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben der Patienten ist, kommen auch verschiedene andere Studien zu diversen Tumorentitäten: Sowohl bei Nierenzellkarzinomen [71], als auch bei Ösophaguskarzinom [72] konnte ein schlechteres Gesamtüberleben bei hoher PD-L1 Expression des

Tumors beobachtet werden. Aber auch bei NSCLC ist bekannt, dass Patienten mit einer PD-L1 Expression von mehr als 5% ein schlechteres Gesamtüberleben zeigen [96].

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Yang et al., die bei früh resezierten NSCLCs ein besseres Gesamtüberleben der Patienten bei PD-L1 Expression des Tumors beobachtet haben [144]. Bei einer Analyse über sämtliche UICC Stadien kam Velcheti et al bezüglich der PD-L1 Expression des NSCLC zum selben Ergebnis [155]. Im Gegensatz zu der von uns eingeschlossenen Kohorte ist die von Yang [144] und Velcheti [155] analysierte Kohorte nicht mehrheitlich in einem metastasiertem Stadium. Bei Yang et al. handelt es sich um resezierte Tumore und Velcheti et al analysierten eine Kohorte, die Patienten in allen 4 UICC Stadien gleichermaßen einschloss. Dies könnte zu den unterschiedlichen Ergebnissen im Vergleich zu unserer Analyse führen. Ein besseres Gesamtüberleben bei vermehrter PD-L1 Expression konnte aber nicht nur bei NSCLC, sondern auch bei anderen Krebserkrankungen beobachtet werden: Taube et al. beschreiben ein verlängertes Gesamtüberleben bei PD-L1 Nachweis auf dem Melanom im Vergleich zu Patienten, die keinen PD-L1 Nachweis auf dem Melanom zeigten [61]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich auf verschiedenen Ursachen zurückführen: unterschiedliche Patientenkollektive und Methodikunterschiede.

Die durchgeführte Überlebensanalyse nach dem progressionsfreien Überleben des Patienten zeigte, dass Patienten mit sehr ausgeprägter PD-L1 Expression auf den Thrombozyten ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Patienten zeigten, bei denen eine sehr geringe PD-L1 Expression bzw. viel PD-L1 auf den Thrombozyten nachgewiesen werden konnte. In dieser Analyse fiel zudem auf, dass die Gruppe, die wenig PD-L1 auf den Thrombozyten exprimierte kein signifikant besseres progressionsfreies Überleben zeigte, wie die Gruppe, die sehr viel PD-L1 exprimierte.

Zu einem gegenteiligen Resultat kam die Arbeitsgruppe um Zhang et al. Diese fanden heraus, dass eine PD-L1 Expression auf dem Tumor unter einer Pemetrexed Therapie ein protektiver Faktor darstellte und damit zu einem

längeren progressionsfreien Überleben des Patienten führte [156]. Im Gegensatz zu dieser Dissertation wurden in diesem Kollektiv nur Patienten unter Pemetrexed untersucht. Eine andere Arbeitsgruppe fand keinen Zusammenhang zwischen dem PD-L1 Status des Tumors und dem progressionsfreien Überleben der Patienten [157].

#### 5.6.2. Überlebensanalyse unter anti-PD-1-Antikörper

Um den Confounder der verschiedenen Therapeutika auszuklammern, wurden in dieser Analyse nur Patienten untersucht, die bei der Blutentnahme einen PD-1 Inhibitor infundiert bekamen. In der Zusammenschau des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens zeigte sich, dass durch die thrombozytäre PD-L1 Expression keine unterschiedlichen Überlebenszeiten unter einem anti-PD-1 Antikörper erreicht werden konnte. Das steht im Kontrast zu den Ergebnissen aus der Gesamtanalyse, in welcher Patienten mit hoher PD-L1 Expression ein signifikant schlechteres Überleben zeigten bzw. ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben erreicht werden konnte (5.6.1). Damit lässt sich jedoch vermuten, dass der Überlebensnachteil von Patienten mit hohen PD-L1 Expressionen auf den Thrombozyten unter Immuncheckpointinhibitoren aufgehoben worden ist, da hier kein Zusammenhang mehr mit hoher PD-L1 Expression und schlechterem Überleben gezeigt werden konnte. Die Hypothese, dass Patienten mit einer PD-L1 Expression auf den Thrombozyten ein besseres Ansprechen zeigten, wie in anderen Studien mit dem PD-L1 Status des Tumors gezeigt [93], ließ sich im Rahmen dieser Dissertation nicht verifizieren. Limitierend lässt sich darauf hinweisen, dass die Subgruppen dieser Analyse eine geringe Personenanzahl aufweist. Zudem ist die Nachbeobachtungszeit dieser Gruppe, im Gegensatz zu anderen Studien, die diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt hatten [94], sehr gering. Demnach sollte in künftigen Studien auf eine längere Nachbeobachtungszeit dieser Patienten, bei Ansprechen des Tumors auf eine PD-1 Therapie geachtet werden. Wie in 5.6.1 bereits limitierend erwähnt, gilt auch für diese Analyse, dass das Kollektiv zu

unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen worden ist, welches als Confounder die Ergebnisse dieser Analyse verzerren könnte.

## 5.7. Ausblick

Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit NSCLC im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine signifikant höhere PD-L1 Expression zeigten. Damit konnte bei Patienten mit solidem Tumor eine vermehrte PD-L1 Expression auf Thrombozyten beschrieben werden. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten konnte diese Expression gesteigert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten PD-L1 mRNA enthalten. Die Ergebnisse dieser Studie könnten maßgeblich dazu beitragen, dass der Thrombozyt und seine Rolle in der Tumorevasion völlig neu überdacht und erforscht werden muss, wobei die thrombozytäre PD-L1 Expression als mögliches Target einer Immuntherapie erforscht und verstanden werden sollte. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass die thrombozytäre PD-L1 Expression bis zur Niederschrift dieser Dissertation nur von zwei anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde und damit unbekannte Störgrößen die thrombozytäre PD-L1 Expression beeinflussen können, die nicht in dieser Studie berücksichtigt wurden. Besonders den Regulationsmechanismen der PD-L1 Expression auf Thrombozyten sollte nachgegangen werden. Des Weiteren bleibt aufgrund der in 5.6 diskutierten Limitationen ungewiss, inwiefern sich der Thrombozyt als Biomarker für ein mögliches Ansprechen auf eine Immuntherapie einsetzen ließe. Die Verifizierung dieser Hypothese sollte durch eine weitaus größere Studienpopulation erfolgen mit engmaschigeren Kontrollen des PD-L1 Status der Thrombozyten. Für die Objektivierung der gefundenen Zusammenhänge sollten Studien mittels klinischer, randomisierter Untersuchungen und einheitlicher Studienpopulationen durchgeführt werden. Auch eine standardisierte Auswahl der verwendeten Antikörper zur Detektion von thrombozytärem PD-L1 muss dabei bedacht werden, um den Vergleich mit der Vorhersagekraft des Tumor PD-L1 besser ziehen zu können.

In dieser Studie wurde zwar thrombozytäres PD-L1 nachgewiesen, jedoch wird nicht untersucht, inwiefern thrombozytäres PD-L1 funktionelle Aufgaben übernimmt. Über eine Funktion von PD-L1 auf Thrombozyten kann demnach nur spekuliert werden.

Es wurden nur Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden untersucht. Das NSCLC wurde dabei als solider Tumor ausgewählt, da die Lunge in der Genese der Thrombozyten eine wichtige Rolle spielt und somit relevant für ein Kontaktpunkt zwischen Tumor und Thrombozyten von Bedeutung sein könnte. Inwiefern die Lunge für die Expression von thrombozytärem PD-L1 wirklich relevant ist, sollte im Rahmen der Untersuchung von thrombozytärem PD-L1 bei anderen soliden Tumoren geklärt werden können.

## 6. Zusammenfassung

Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit [2]. Ein Therapieansatz, der das Leben dieser Patienten verlängern kann, ist der Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren [74]. Als Biomarker für ein Ansprechen auf solch eine Immuntherapie wird die Expression von PD-L1 auf dem Tumor verwendet. Basierend auf den Ergebnissen von Vorarbeiten mit Proteinübergängen vom Thrombozyten auf den Tumor [37], wurden die Thrombozyten im Rahmen dieser Dissertation auf eine mögliche PD-L1 Expression untersucht, um diese als Biomarker für die PD-L1 Expression des Tumors im Sinne einer Liquid Biopsie zu verwenden.

Anhand von 122 Tumorpatienten und 47 Kontrollprobanden konnte gezeigt werden, dass sowohl gesunde Kontrollprobanden als auch Patienten mit einer soliden Tumorerkrankung thrombozytäres PD-L1 exprimieren. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten zeigten jedoch Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom eine signifikant höhere PD-L1 Expression auf ihren Thrombozyten. Diese thrombozytäre PD-L1 Expression war dabei nicht von der

Histologie des Tumors, dem Geschlecht der Probanden, der Raucheranamnese oder dem UICC-Stadium abhängig. Bei der Zusammenschau der Therapien, während welcher die Blutproben abgenommen wurden, konnte bei Patienten ohne Checkpointinhibitor eine signifikant höhere Expression detektiert werden als bei Patienten mit anti-PD-1 Antikörper. Bei Patienten unter Therapie mit dem anti-PD-L1-Antikörper Atezolizumab zeigte sich eine signifikant reduzierte PD-L1 Expression in der Durchflusszytometrie. Ursächlich ist die sterische Hinderung der Bindung des FACS-Antikörpers. Die Ergebnisse belegen, dass Atezolizumab an pPD-L1 bindet. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten mittels TRAP-6 konnte die thrombozytäre PD-L1 Expression gesteigert werden. In Zusammenschau der Laborparametern und der thrombozytären PD-L1 Expression konnte nachgewiesen werden, dass die thrombozytäre PD-L1 Expression weder von der Anzahl der Lymphozyten, noch des C-reaktiven Proteins abhängig ist. Thrombozytäres PD-L1 war in dieser Analyse mit der Serum Laktatdehydrogenase-Aktivität assoziiert.

Um die Herkunft des thrombozytären PD-L1 zu klären, wurden im Rahmen dieser Studie zwei Theorien untersucht. Die eine Theorie ging davon aus, dass durch Tumor-Plättchen-Interaktionen der Ligand PD-L1 vom Tumor auf den Thrombozyten übergehen kann. Dies wurde anhand einer Korrelationsanalyse bezüglich der PD-L1 Expression des Primarius im Vergleich zu thrombozytärer PD-L1 Expression untersucht. Dabei konnte keine vermehrte Expression des thrombozytären PD-L1 bei hoher PD-L1 Expression des Tumors gefunden werden. Die zweite Theorie, die in Zusammenhang mit der Herkunft des thrombozytären PD-L1 Expression untersucht wurde, war die eigenständige PD-L1 Produktion des Thrombozyten durch Translation von mRNA. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hohen Expression in der durchflusszytometrischen Analyse auch vermehrt PD-L1 mRNA exprimierten. Eine Expression von PD-L1 mRNA konnte dabei sowohl in gesunden Kontrollen als auch in Patienten mit NSCLC nachgewiesen werden.

Um die Funktionalität als Biomarker zu testen, wurden Kaplan-Meier-Korrelationsanalysen verwendet. Dabei zeigte sich, dass, bezugnehmend auf das Gesamtüberleben der Patienten, eine geringe

thrombozytäre PD-L1 Expression einen Überlebensvorteil darstellte. Beim progressionsfreien Überleben zeigte sich, dass Patienten, die eine sehr ausgeprägte thrombozytäre PD-L1 Expression hatten, ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben zeigten, als Patienten mit sehr wenig und viel PD-L1 Expression. Damit konnte gezeigt werden, dass hohes thrombozytäres PD-L1, unabhängig von anderen Faktoren, einen negativen prognostischen Biomarker darstellte.

## References

1. Robert Koch-Institut Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016
2. Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC): Stand April 2017. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@view/html/index.html>
3. Statistisches Bundesamt Staat & Gesellschaft - Todesursachen : Ausgewählte Todesursachen 2015. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Accessed 13 Mar 2018
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD et al. (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 83(5): 584–594. doi: 10.4065/83.5.584
5. Herold G (ed) (2016) Innere Medizin 2016: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Selbstverlag, Köln
6. Onkologie L S3-Leitlinie Lungenkarzinom. 02/2018 AWMF-Registernummer: 020/007OL
7. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang Y-W et al. (2015) Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta* 1856(2): 189–210. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.08.002
8. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N et al. (2017) Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung cancer. *N Engl J Med* 376(22): 2109–2121. doi: 10.1056/NEJMoa1616288
9. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M et al. (2010) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms (Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer). *Pneumologie* 64 Suppl 2: e1-164. doi: 10.1055/s-0029-1243837
10. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J et al. (2016) The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 11(1): 39–51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009
11. Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung cancer: Current diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106(49): 809-18; quiz 819-20. doi: 10.3238/arztebl.2009.0809
12. Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R et al. (eds) (2006) Das Rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie ; [mit 150 Therapie-Protokollen], 3., überarb. und erw. Aufl. ecomed Medizin. ecomed, Landsberg/Lech
13. Schiller JH, Harrington D, Belani CP et al. (2002) Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346(2): 92–98. doi: 10.1056/NEJMoa011954

14. Scagliotti GV, Marinis F de, Rinaldi M et al. (2002) Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 20(21): 4285–4291. doi: 10.1200/JCO.2002.02.068
15. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (2011) *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
16. Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A et al. (2017) The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544(7648): 105–109. doi: 10.1038/nature21706
17. Hanson SR, Slichter SJ (1985) Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: Evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 66(5): 1105–1109
18. Yan M, Jurasz P (2016) The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1863(3): 392–400. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.008
19. Holinstat M (2017) Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev* 36(2): 195–198. doi: 10.1007/s10555-017-9677-x
20. Boilard E, Nigrovic PA (2017) Platelets. In: Firestein GS, McInnes IB, O'Dell JR et al. (eds) *Kelley and Firestein's textbook of rheumatology*, Tenth edition. Elsevier, Philadelphia, PA, 264-273.e3
21. Semple JW, Italiano JE, Freedman J (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11(4): 264–274. doi: 10.1038/nri2956
22. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS et al. (2009) Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 7(11): 1759–1766. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x
23. Rendu F, Brohard-Bohn B (2001) The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12(5): 261–273. doi: 10.1080/09537100120068170
24. Warshaw AL, Laster L, Shulman NR (1967) Protein synthesis by human platelets. *J Biol Chem* 242(9): 2094–2097
25. Weyrich AS, Lindemann S, Tolley ND et al. (2004) Change in protein phenotype without a nucleus: Translational control in platelets. *Semin Thromb Hemost* 30(4): 491–498. doi: 10.1055/s-2004-833484
26. Newman PJ, Gorski J, White GC et al. (1988) Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 82(2): 739–743. doi: 10.1172/JCI113656
27. Denis MM, Tolley ND, Bunting M et al. (2005) Escaping the nuclear confines: Signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122(3): 379–391. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.015
28. Karpatkin S (1969) Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. *J Clin Invest* 48(6): 1073–1082. doi: 10.1172/JCI106063
29. White GC II, Rompietti R. (2007) Platelet secretion: indiscriminately spewed forth or highly orchestrated? *J Thromb Haemost* 5

30. Larsen E, Celi A, Gilbert GE et al. (1989) PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59(2): 305–312. doi: 10.1016/0092-8674(89)90292-4
31. Del Conde I, Cruz MA, Zhang H et al. (2005) Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med* 201(6): 871–879. doi: 10.1084/jem.20041497
32. (1996) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *The Lancet* 348(9038): 1329–1339. doi: 10.1016/S0140-6736(96)09457-3
33. Karpatkin S, Pearlstein E (1981) Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann Intern Med* 95(5): 636–641
34. Pedersen LM, Milman N (1996) Prognostic significance of thrombocytosis in patients with primary lung cancer. *Eur Respir J* 9(9): 1826–1830
35. Parise, L. V., S. S. Smyth, and B. S. Coller (ed) (2001) "Williams Hematology."
36. Kopp H-G, Placke T, Salih HR (2009) Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 69(19): 7775–7783. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2123
37. Placke T, Örgel M, Schaller M et al. (2012) Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 72(2): 440–448. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1872
38. Placke T, Salih HR, Kopp H-G (2012) GITR ligand provided by thrombopoietic cells inhibits NK cell antitumor activity. *J Immunol* 189(1): 154–160. doi: 10.4049/jimmunol.1103194
39. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B et al. (1999) Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 59(6): 1295–1300
40. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759–767
41. Boon T, Cerottini JC, van den Eynde B et al. (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337–365. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002005
42. Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 39(1): 1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
43. Zou W, Chen L (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8(6): 467–477. doi: 10.1038/nri2326
44. Chen DS, Irving BA, Hodi FS (2012) Molecular pathways: Next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res* 18(24): 6580–6587. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1362
45. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K et al. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11(11): 3887–3895

46. Zhang X, Schwartz J-CD, Guo X et al. (2004) Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1. *Immunity* 20(5): 651. doi: 10.1016/S1074-7613(04)00114-1
47. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H et al. (1996) Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8(5): 765–772
48. Nishimura H, Nose M, Hiai H et al. (1999) Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* 11(2): 141–151. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80089-8
49. Hiroyuki Nishimura,<sup>1</sup> Taku Okazaki,<sup>1</sup> Yoshimasa Tanaka,<sup>2</sup> Kazuki Nakatani,<sup>6</sup> Masatake Hara,<sup>3</sup> Akira Matsumori,<sup>3</sup> Shigetake Sasayama,<sup>3</sup> Akira Mizoguchi,<sup>4</sup> Hiroshi Hiai,<sup>5</sup> Nagahiro Minato,<sup>2</sup> Tasuku Honjo<sup>1</sup> (2001) Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor–Deficient Mice
50. Jin H-T, Ahmed R, Okazaki T (2011) Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 350: 17–37. doi: 10.1007/82\_2010\_116
51. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999, 5(12):1365–1369(5(12)): 1365–1369
52. Dong H, Strome SE, Salomao DR et al. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8(8): 793–800. doi: 10.1038/nm730
53. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R et al. (2003) Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 170(3): 1257–1266. doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1257
54. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y et al. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192(7): 1027–1034
55. Latchmann, Y. Wood, C.R. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*
56. Mazanet MM, Hughes CCW (2002) B7-H1 Is Expressed by Human Endothelial Cells and Suppresses T Cell Cytokine Synthesis. *The Journal of Immunology* 169(7): 3581–3588. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3581
57. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB et al. (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27(1): 111–122. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.016
58. Yang J, Riella LV, Chock S et al. (2011) The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 187(3): 1113–1119. doi: 10.4049/jimmunol.1100056
59. Park J-J, Omiya R, Matsumura Y et al. (2010) B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 116(8): 1291–1298. doi: 10.1182/blood-2010-01-265975

60. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H et al. (2002) Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *The Journal of Immunology* 169(10): 5538–5545. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5538
61. Taube JM, Andres RA, Young GD, Xu H, Sharman R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL and Chen L (2012) Colocalisation of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Trans Med*
62. He X-h, Xu L-h, Liu Y (2005) Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking IgV-like domain. *Acta Pharmacol Sin* 26(4): 462–468. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00086.x
63. Sanmamed MF, Chen L (2014) Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J* 20(4): 256–261. doi: 10.1097/PPO.000000000000061
64. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
65. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A et al. (2017) Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res* 5(6): 480–492. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0329
66. Frigola X, Inman BA, Lohse CM et al. (2011) Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 17(7): 1915–1923. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0250
67. Zhang J, Gao J, Li Y et al. (2015) Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac Cancer* 6(4): 534–538. doi: 10.1111/1759-7714.12247
68. Marzec M, Zhang Q, Goradia A et al. (2008) Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52): 20852–20857. doi: 10.1073/pnas.0810958105
69. Parsa AT, Waldron JS, Panner A et al. (2007) Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 13(1): 84–88. doi: 10.1038/nm1517
70. Coelho MA, Carné Trécesson S de, Rana S et al. (2017) Oncogenic RAS Signaling Promotes Tumor Immunoresistance by Stabilizing PD-L1 mRNA. *Immunity* 47(6): 1083-1099.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.016
71. R. Houston Thompson\* (2004) Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target
72. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y et al. (2005) Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 11(8): 2947–2953. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1469

73. Hino R, Kabashima K, Kato Y et al. (2010) Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116(7): 1757–1766. doi: 10.1002/cncr.24899
74. Herbst RS, Baas P, Kim D-W et al. (2016) Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *The Lancet* 387(10027): 1540–1550. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7
75. Carreno BM, Collins M (2002) The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20: 29–53. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806
76. Bretscher PA (1999) A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 185–190. doi: 10.1073/pnas.96.1.185
77. Freeman GJ (2008) Structures of PD-1 with its ligands: Sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10275–10276. doi: 10.1073/pnas.0805459105
78. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W et al. (2012) Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 209(6): 1201–1217. doi: 10.1084/jem.20112741
79. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA (2016) The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* 7: 550. doi: 10.3389/fimmu.2016.00550
80. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H et al. (2001) PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13866–13871. doi: 10.1073/pnas.231486598
81. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE et al. (2004) SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology* 173(2): 945–954. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945
82. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA et al. (2005) CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25(21): 9543–9553. doi: 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005
83. Patsoukis N, Li L, Sari D et al. (2013) PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol Cell Biol* 33(16): 3091–3098. doi: 10.1128/MCB.00319-13
84. Kane LP, Andres PG, Howland KC et al. (2001) Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. *Nat Immunol* 2(1): 37–44. doi: 10.1038/83144
85. Barthel A, Okino ST, Liao J et al. (1999) Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem* 274(29): 20281–20286

86. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev* 13(22): 2905–2927
87. Patsoukis N, Brown J, Petkova V et al. (2012) Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal* 5(230): ra46. doi: 10.1126/scisignal.2002796
88. Boussiotis VA, Chatterjee P, Li L (2014) Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications. *Cancer J* 20(4): 265–271. doi: 10.1097/PPO.000000000000059
89. Crespo J, Sun H, Welling TH et al. (2013) T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25(2): 214–221. doi: 10.1016/j.coi.2012.12.003
90. Zak KM, Kitel R, Przetocka S et al. (2015) Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* 23(12): 2341–2348. doi: 10.1016/j.str.2015.09.010
91. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I et al. (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28(19): 3167–3175. doi: 10.1200/JCO.2009.26.7609
92. Sunshine J, Taube JM (2015) PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 23: 32–38. doi: 10.1016/j.coph.2015.05.011
93. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH et al. (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515(7528): 568–571. doi: 10.1038/nature13954
94. Topalian Suzanne L., Hodi F. Stephen, Brahmer Julie R. et al. (2012) Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer
95. Taube JM, Klein A, Brahmer JR et al. (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 20(19): 5064–5074. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3271
96. Casadevall D, Clavé S, Taus Á et al. (2017) Heterogeneity of Tumor and Immune Cell PD-L1 Expression and Lymphocyte Counts in Surgical NSCLC Samples. *Clinical Lung Cancer*. doi: 10.1016/j.clc.2017.04.014
97. EMA OPDIVO, INN-nivolumab. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/opdivo-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_en.pdf). Accessed 09 Feb 2019
98. Lee JY, Lee HT, Shin W et al. (2016) Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Nat Commun* 7: 13354. doi: 10.1038/ncomms13354
99. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L et al. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373(17): 1627–1639. doi: 10.1056/NEJMoa1507643
100. Reinmuth N, Gröschel A, Schumann C et al. (2018) Aktualisierte Therapieempfehlung metastasiertes nicht kleinzelliges Lungenkarzinom

- (Updated Recommendation for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer). *Pneumologie* 72(2): 138–154. doi: 10.1055/s-0043-118904
101. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P et al. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373(2): 123–135. doi: 10.1056/NEJMoa1504627
  102. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* 44(5): 1069–1078. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.023
  103. Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. (2015) Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372(21): 2018–2028. doi: 10.1056/NEJMoa1501824
  104. Die rote Liste Pembrolizumab. Accessed 14 Feb 2019
  105. Onkopedia Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). [https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@\\_@view/html/index.html](https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@_@view/html/index.html). Accessed 14 Feb 2019
  106. FDA KEYTRUDA (pembrolizumab
  107. EMA (2019) Tecentriq, INN-atezolizumab. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information_de.pdf)
  108. Rote Liste Atezolizumab. <https://online.rote-liste.de/suche/praep/26883/Tecentriq%C2%AE%201.200%20mg%20Konzentrat%20zur%20Herstellung%20einer%20Infusionsl%C3%B6sung>. Accessed 14 Feb 2019
  109. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M et al. (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515(7528): 563–567. doi: 10.1038/nature14011
  110. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al. (2016) Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): A multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet* 387(10030): 1837–1846. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0
  111. EMA (2019) Imfinzi, INN-durvalumab. [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180921142224/anx\\_142224\\_de.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180921142224/anx_142224_de.pdf)
  112. EMA (2019) Bavencio, INN-avelumab. [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170918138675/anx\\_138675\\_de.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170918138675/anx_138675_de.pdf)
  113. (2019) Key Statistics for Lung Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/key-statistics.html>. Accessed 28 Apr 2019
  114. Haratake N, Toyokawa G, Tagawa T et al. (2017) Positive Conversion of PD-L1 Expression After Treatments with Chemotherapy and Nivolumab. *Anticancer Res* 37(10): 5713–5717. doi: 10.21873/anticancer.12009
  115. Wiesner T, Bugl S, Mayer F et al. (2010) Differential changes in platelet VEGF, Tsp, CXCL12, and CXCL4 in patients with metastatic cancer. *Clinical*

- & *Experimental Metastasis* 27(3): 141–149. doi: 10.1007/s10585-010-9311-6
116. Brown M, Wittwer C (2000) *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. *Clinical Chemistry* 46(8): 1221–1229
  117. S Wulff, K Martin, A Vandergaw, T Boenisch *Guide to flow cytometry: Educational guide 2nd Edition*
  118. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>. Accessed 28 Apr 2019
  119. (2016) *Streuprobleme in der Durchflusszytometrie*. <https://www.ptb.de/cms/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>. Accessed 25 Apr 2019
  120. *Primer Design Beginners Guide to real time PCR*
  121. *Oligotex mRNA Mini Kit - QIAGEN Online Shop*. <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/rna/mrna/oligotex-mrna-mini-kit/#productdetails>. Accessed 14 May 2019
  122. *QuantiTect Primer Assays - QIAGEN Online Shop*. <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-primer-assays/?catno=QT00082775#geneglobe>. Accessed 03 Jan 2018
  123. Akamine T, Takada K, Toyokawa G et al. (2018) Association of preoperative serum CRP with PD-L1 expression in 508 patients with non-small cell lung cancer: A comprehensive analysis of systemic inflammatory markers. *Surgical Oncology* 27(1): 88–94. doi: 10.1016/j.suronc.2018.01.002
  124. Prestipino A, Emhardt AJ, Aumann K et al. (2018) Oncogenic JAK2V617F causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med* 10(429). doi: 10.1126/scitranslmed.aam7729
  125. Hinterleitner C, Strähle J, Wirths S et al. (2017) Platelet Programmed Cell Death Ligand 1 (pPDL-1) Is a Prognostic Marker in Advanced Lung Cancer. *Blood* 130(Suppl 1): 3610
  126. Rolfes V, Idel C, Pries R et al. (2018) PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget* 9(44): 27460–27470. doi: 10.18632/oncotarget.25446
  127. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D et al. (2017) PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 12(2): 208–222. doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.2228
  128. Zhang Y, Zhou Y, Lou J et al. (2010) PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care* 14(6): R220. doi: 10.1186/cc9354
  129. Chen Y, Wang Q, Shi B et al. (2011) Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well

- as supernatants of PD-L1+ cell lines. *Cytokine* 56(2): 231–238. doi: 10.1016/j.cyto.2011.06.004
130. Furie B, Furie BC (2004) Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 10(4): 171–178. doi: 10.1016/j.molmed.2004.02.008
131. Sheng J, Fang W, Yu J et al. (2016) Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 6: 20090. doi: 10.1038/srep20090
132. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M et al. (2004) B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 10(15): 5094–5100. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0428
133. Cheng S, Zheng J, Zhu J et al. (2015) PD-L1 gene polymorphism and high level of plasma soluble PD-L1 protein may be associated with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 30(4): e364-8. doi: 10.5301/ijbm.5000170
134. Azuma K, Ota K, Kawahara A et al. (2014) Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol* 25(10): 1935–1940. doi: 10.1093/annonc/mdu242
135. Mino-Kenudson M (2016) Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: Could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med* 13(2): 157–170. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0009
136. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V et al. (2015) PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 112(1): 95–102. doi: 10.1038/bjc.2014.555
137. Takada K, Okamoto T, Shoji F et al. (2016) Clinical Significance of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Primary Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 11(11): 1879–1890. doi: 10.1016/j.jtho.2016.06.006
138. Ghebeh H, Lehe C, Barhoush E et al. (2010) Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: Role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res* 12(4): R48. doi: 10.1186/bcr2605
139. Zhang P, Su D-M, Liang M et al. (2008) Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis. *Mol Immunol* 45(5): 1470–1476. doi: 10.1016/j.molimm.2007.08.013
140. Chatterjee S, Lesniak WG, Gabrielson M et al. (2016) A humanized antibody for imaging immune checkpoint ligand PD-L1 expression in tumors. *Oncotarget* 7(9): 10215–10227. doi: 10.18632/oncotarget.7143
141. Boneu B, Bugat R, Boneu A et al. (1984) Exhausted platelets in patients with malignant solid tumors without evidence of active consumption coagulopathy. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 20(7): 899–903. doi: 10.1016/0277-5379(84)90161-5

142. Kluger HM, Zito CR, Barr ML et al. (2015) Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. *Clin Cancer Res* 21(13): 3052–3060. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3073
143. Diem S, Kasenda B, Spain L et al. (2016) Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 114(3): 256–261. doi: 10.1038/bjc.2015.467
144. Yang C-Y, Lin M-W, Chang Y-L et al. (2016) Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage I pulmonary squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 57: 91–103. doi: 10.1016/j.ejca.2015.12.033
145. Kuznetsov HS, Marsh T, Markens BA et al. (2012) Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. *Cancer Discov* 2(12): 1150–1165. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0216
146. Chen CH, Lo RW, Urban D et al. (2017)  $\alpha$ -granule biogenesis: From disease to discovery. *Platelets* 28(2): 147–154. doi: 10.1080/09537104.2017.1280599
147. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC et al. (2016) Prädiktive PD-L1-Immunhistochemie beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom: Aktueller Stand und Erfahrungen der ersten deutschen Harmonisierungsstudie (Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer : Current state of the art and experiences of the first German harmonization study). *Pathologe* 37(6): 557–567. doi: 10.1007/s00292-016-0189-1
148. Ilie M, Long-Mira E, Bence C et al. (2016) Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: A potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol* 27(1): 147–153. doi: 10.1093/annonc/mdv489
149. Erber R, Stöhr R, Herlein S et al. (2017) Comparison of PD-L1 mRNA Expression Measured with the CheckPoint Typer® Assay with PD-L1 Protein Expression Assessed with Immunohistochemistry in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res* 37(12): 6771–6778. doi: 10.21873/anticancer.12137
150. Healy AM, Pickard MD, Pradhan AD et al. (2006) Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation* 113(19): 2278–2284. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607333
151. Rondina MT, Schwertz H, Harris ES et al. (2011) The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J Thromb Haemost* 9(4): 748–758. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04208.x
152. Best MG, Sol N, Kooi I et al. (2015) RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 28(5): 666–676. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.018

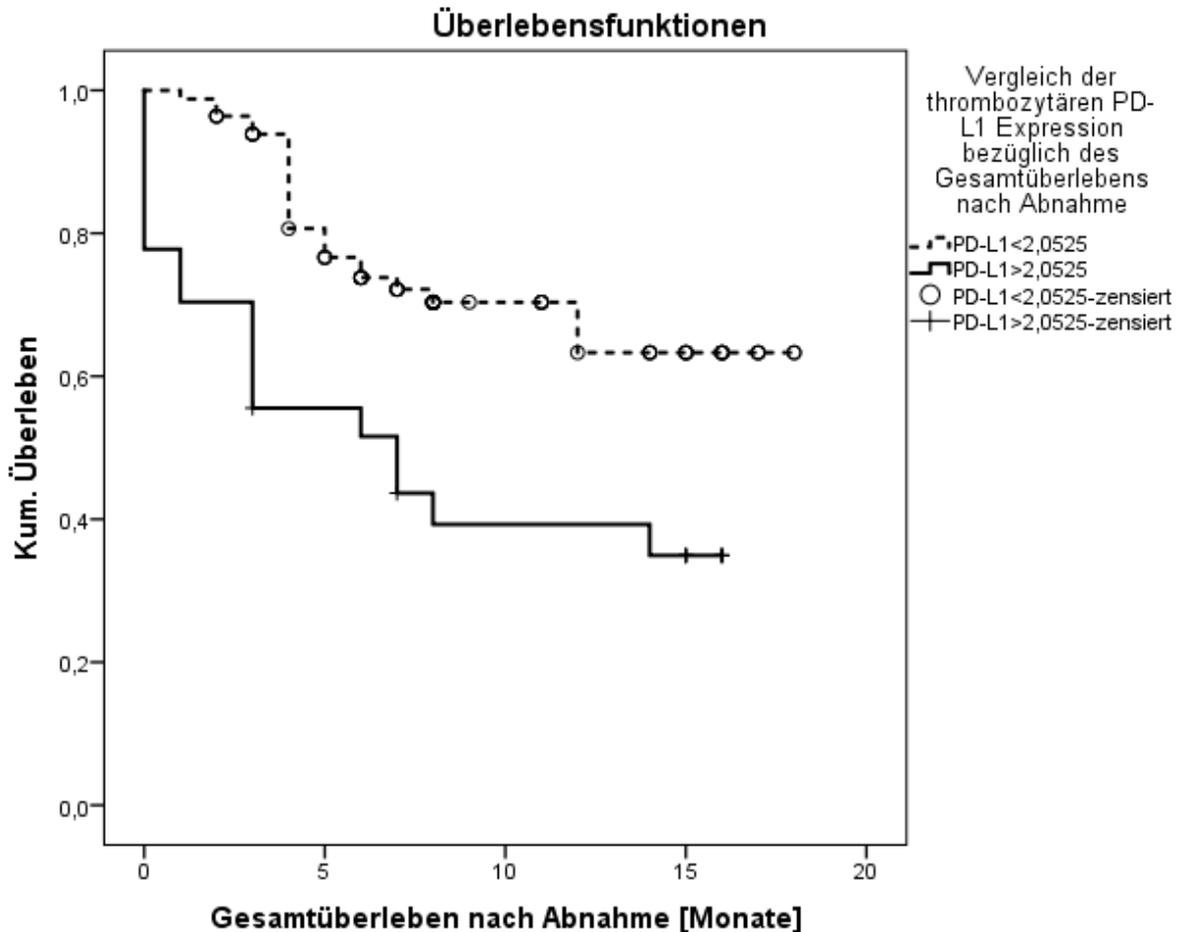
153. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E et al. (2011) Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 118(13): 3680–3683. doi: 10.1182/blood-2011-03-344408
154. Zhao J, Zhang P, Wang J et al. (2017) Plasma levels of soluble programmed death ligand-1 may be associated with overall survival in nonsmall cell lung cancer patients receiving thoracic radiotherapy. *Medicine (Baltimore)* 96(7): e6102. doi: 10.1097/MD.00000000000006102
155. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE et al. (2014) Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 94(1): 107–116. doi: 10.1038/labinvest.2013.130
156. Zhang P, Bao Z, Xu L et al. (2017) PD-L1 expression indicates favorable prognosis for advanced lung adenocarcinoma patients treated with pemetrexed. *Oncotarget* 8(39): 66293–66304. doi: 10.18632/oncotarget.19973
157. Igawa S, Ryuge S, Ichinoe M et al. (2017) Impact of EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors on Postoperative Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring EGFR Mutations. *Oncol Res Treat* 40(1-2): 7–13. doi: 10.1159/000455147

Die Daten dieser Dissertation wurden präsentiert als

- Poster bei der ASH-Konferenz 2017 durch C. Hinterleitner
- Vortrag auf der DGHO-Konferenz 2018 durch C. Hinterleitner

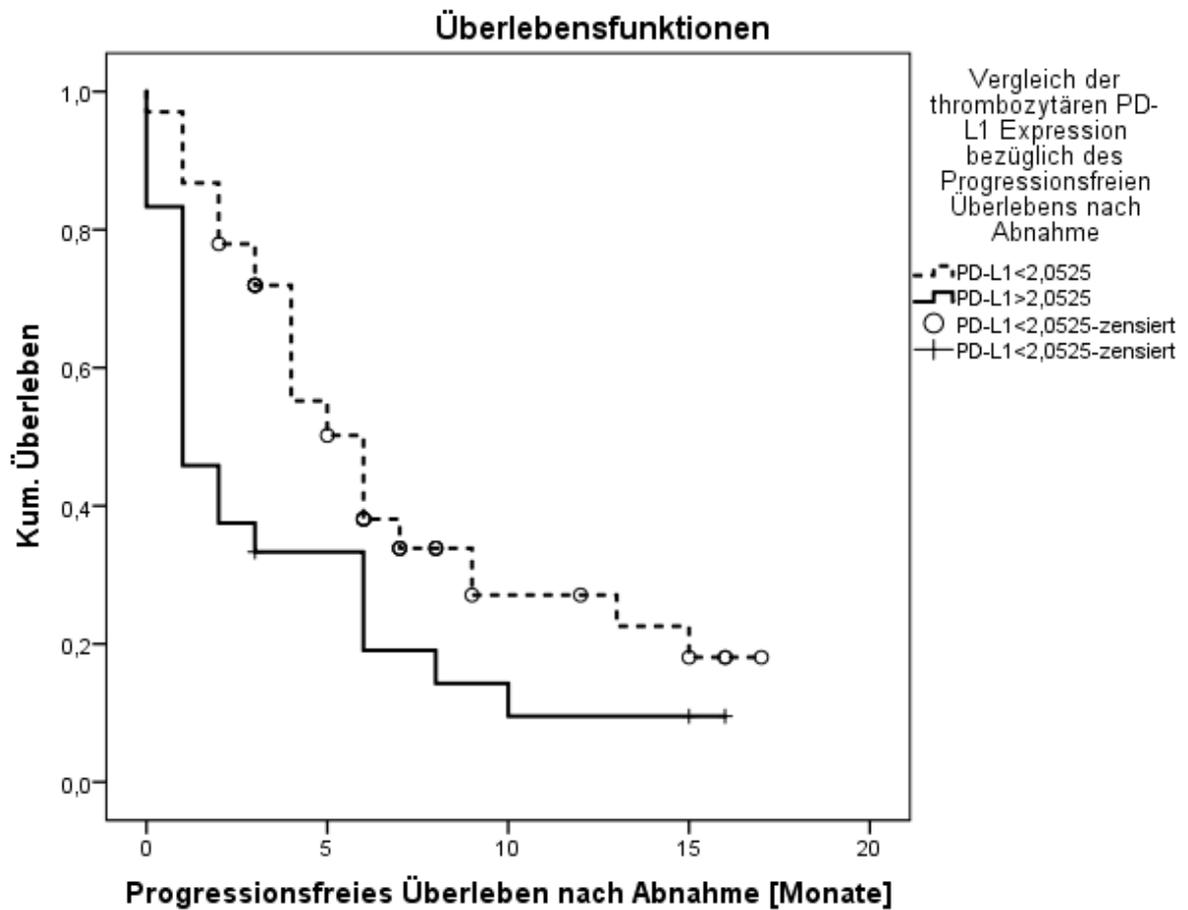
## Anhang:

### Anhang-Abbildungen



*Anhang-Abbildung 3: Übersichtlichere Darstellung des OS der Gesamtpopulation (Log Rank  $p=0,001$ )*

In dieser Kaplan-Meier- Berechnung konnte gezeigt werden, dass Patienten, die sehr viel PD-L1 auf ihren Thrombozyten exprimieren im Vergleich zu Patienten, die weniger PD-L1 (hier Gruppe 1-3) exprimieren ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben zeigen (Log-Rank  $p=0,001$ )



*Anhang-Abbildung 4: Übersichtlichere Darstellung des PFS der Gesamtpopulation (Log-Rank  $p=0,008$ )*

In Zusammenschau des Progressionsfreien Überleben zeigt sich, dass Patienten, die sehr viel PD-L1 exprimieren ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben zeigen im Vergleich zu Patienten, die weniger PD-L1 exprimieren (Log Rank: Gruppe 1-3 vs. Gruppe 4:  $p=0,008$ ).

## Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie

### Thrombozytäre PDL-1 Expression als potentieller Biomarker in soliden und hämatologischen Tumoren

Hiermit erkläre ich \_\_\_\_\_ geb. am \_\_\_\_\_

nach Aufklärung durch \_\_\_\_\_ meine Zustimmung zur Entnahme von ca. 25 ml Blut für wissenschaftliche Zwecke.

Über folgende Punkte wurde ich informiert:

- Im Rahmen der Studie erfolgen lediglich Blutentnahmen und anschließend wissenschaftliche Untersuchungen der Proben im Labor.
- Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig und kann jederzeit (auch nach Abschluss der Behandlung) ohne Angabe von Gründen bei der unten angegebenen Kontaktstelle mündlich oder schriftlich widerrufen werden, ohne dass dies nachteilige Folgen für die weitere medizinische Behandlung hat.
- Ziel dieser Studie ist es in Zukunft eine Gruppe von Patienten mit soliden und hämatologischen Tumoren durch eine einfache Blutuntersuchung identifizieren zu können, die besonders von einer modernen Immuntherapie profitieren. Hierzu soll die Oberflächenexpression des Membraneiweißes PDL-1 auf den Blutplättchen untersucht werden. Wiederholte invasive Eingriffe zur Tumorgewebegewinnung wären so in Zukunft ggf. weitaus weniger nötig. Aus der geplanten Blutentnahme entsteht mir kein persönlicher Nutzen. Die Entnahme erfolgt wenn möglich im Rahmen einer Routineblutentnahme.
- Die erhobenen Informationen werden mit Hilfe von mehrstelligen Identifikationsnummern verschlüsselt und in eine elektronische Datenbank eingetragen. Diese elektronische Datenbank ist durch einen Schutzwall (Firewall) vor einem Zugriff von außen geschützt und unterliegt selbstverständlich der ärztlichen Schweigepflicht. Die gewonnenen Daten werden voraussichtlich 10 Jahre aufbewahrt. Gewonnene Daten können in Form von wissenschaftlichen Abhandlungen (z.B. Doktorarbeiten oder Publikationen in Fachzeitschriften) in anonymisierter Form weitergegeben werden.

---

Tübingen, den

---

Unterschrift

---

Name des Patienten/der Patientin in  
Blockschrift

---

Tübingen, den

---

Unterschrift

---

Name des aufklärenden Arztes/  
Wissenschaftlers in Blockschrift

## Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik II unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kopp durchgeführt.

Die Konzeption dieser Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Kopp und Herrn Dr. Clemens Hinterleitner.

Die Arbeit im Labor wurde größtenteils von Frau Elke Malenke betreut. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Elke Malenke und Frau Dr. rer. nat. Stefanie Bugl von mir eigenständig durchgeführt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte nach einer Idee von Herrn Dr. Stefan Wirths, Prof. Hans-Georg Kopp und Frau Elke Malenke. Die Auswertung und Erhebung der hier dargestellten Daten erfolgte durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich nach Beratung durch das Institut für Biometrie nach Anleitung von Frau Dr. phil. Bettina Brendel.

An der Erstkorrektur des Manuskripts waren Frau Jasmin Knoll, Herr Dr. Daniel Hessling und Frau Elke Malenke beteiligt.

Die Daten dieser Dissertation wurde von Herrn Dr. Hinterleitner mit einem Poster auf dem ASH-Kongress 2017 präsentiert und mit einem Vortrag auf der DGHO 2018 vorgestellt.

Ich versichere das Manuskript eigenständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir genannten Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 18.06.2020

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, die bei dieser Studie teilgenommen haben und durch ihre Blutspende einen großen Beitrag zu dieser Dissertation und einen Beitrag zum Verstehen Ihrer Erkrankung beigetragen haben. Ohne sie wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Hans-Georg Kopp für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung während der Arbeit an dieser Dissertation bedanken.

Bei Elke Malenke möchte ich mich ganz besonders bedanken für Ihre exzellente und engagierte Betreuung, die mich stets im Labor unterstützte und anleitete und diese Dissertation ausdauernd von den ersten Versuchen im Labor über die Korrektur des Erstmanuskript bis zur endgültigen Fertigstellung unterstützt hat.

Dr. Clemens Hinterleitner danke ich für die fortwährende ärztliche Unterstützung und Inspiration und seinen fortwährenden Ideen zur Vertiefung dieser Arbeit.

Außerdem schulde ich großen Dank den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen, allen voran Dr. Stefanie Bugl für die Einarbeitung bei den ersten Versuchen zu dieser Dissertation und die immer freundliche Unterstützung bei aufkommenden Fragen und Problemen. Danke auch an alle anderen wissenschaftlichen Mitarbeiter im Labor, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Zudem danke ich auch dem IZKF für die Aufnahme in das IZKF- Promotionskolleg, sowie die finanzielle und ideelle Förderung dieser Dissertation.

Bei Dr. phil. Bettina Brendel möchte ich mich für die Unterstützung und Beratung bei der Erstellung der Statistik in dieser Dissertation bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen beiden Erstmanuskriptkorrektoren meiner langjährigen Schulfreundin Jasmin Knoll und meinem Freund Dr. Daniel Hessling bedanken.

Last but not least, gilt ein besonderer Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Gaby und Thomas Strähle, sowie meinem Bruder Julian Strähle. Danke, dass ihr mich auf all meinen Wegen begleitet und unterstützt und für mich da seid.