

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Analyse der Expression von PD-1, PD-L1, TrkA, NGF und p75 auf
Tumorzellen des Merkelzellkarzinoms und auf Zellen des
tumorumbgebenden Stromas**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sophie Stern

aus Heidelberg

Kiel 2021

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Friederike Egberts, Dermatologikum Kiel
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Felix Braun, Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.10.2021

gez. Priv.-Doz. Dr. med. Sascha Gerdes
(Prof. Dr. Franziska Theilig)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Stadieneinteilung des MCC	1
I.2 Diagnostik, Prognose, Therapie und Metastasierung des MCC	2
I.3 PD-1/PD-L1-Signalweg	3
I.4 NGF/TrkA/p75-Signalweg.....	4
I.5 Fragestellungen der Arbeit	7
II. Patienten, Material und Methoden	8
II.1 Patientenkollektiv, Untersuchungsmaterial und Datenerhebung	8
II.2 Laborchemische Methoden	9
II.3 Auswertung.....	10
II.4 Statistische Methoden	11
III. Ergebnisse.....	12
III.1 Patientendaten	12
III.2 Expression von CK20, SYN und MCPyV	13
III.3 Peritumorale Infiltration von Entzündungszellen, CD68-Expression	14
III.4 Expression von PD-1 und PD-L1	15
III.5 Expression von NGF, TrkA und p75	18
III.6 Zusammenfassende Darstellungen der Ergebnisse	21
III.7 Statistische Auswertung.....	23
III.7.1 Korrelationsanalyse	23
III.7.2 Vergleich der Untergruppen	23
III.7.3 Überlebenszeitanalyse.....	23
IV. Diskussion.....	26
IV.1 Expression von PD-1 und PD-L1	27
IV.2 Expression von NGF, TrkA und p75.....	29
IV.3 Koexpression von PD-L1 und NGF auf CD68+ Spindelzellen	31
IV.4 Überleben	33

IV.5 Mögliche neue Therapieansätze	34
IV.6 Fazit.....	36
V. Zusammenfassung	39
Literaturverzeichnis	41
Tabellen und Abbildungen	46
Danksagung	48
Anhang	49
Veröffentlichungen	52

GLOSSAR

(verwendete Abkürzungen; alphabetisch)

CK20	Zytokeratin 20
DZ	Dendritische Zelle(n)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
M	Status Fernmetastasen
MM	Malignes Melanom
MCC	Merkelzellkarzinom
MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus
N	Status regionaler Lymphknoten
NET	Neuroendokriner Tumor
NGF	Nerve Growth Factor
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
p75	Neurotrophinrezeptor p75
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death protein 1 Ligand 1
PD-L2	Programmed cell death protein 1 Ligand 2
SHP2	Scr homology region 2 domain-containing phosphatase-2
SLNB	Sentinel-Lymphknotenbiopsie
SYN	Synaptophysin
T	Ausdehnung des Primärtumors
TBS	Tris-Kochsalz-Puffer-Lösung
TIL	Tumorerinfiltrierende Lymphozyten
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3
Trk	Tyrosinrezeptorkinase
TrkA	Tropomyosinrezeptorkinase A
UICC	Union internationale contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

I. Einleitung

I.1 Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Stadieneinteilung des MCC

Das Merkelzellkarzinom (MCC) ist ein seltenes, aber aggressives neuroendokrines Karzinom der Haut, dessen Ursprung wahrscheinlich die Merkelzellen, Mechanorezeptorzellen der Haut, sind [1]–[3]. Neuroendokrine Tumoren (NET) definieren sich durch die Sekretion von biogenen Aminen oder Hormonen wie Chromogranin A oder Synaptophysin (SYN) und teilen histologische Merkmale.

Die Inzidenz des MCC steigt seit Jahren und liegt aktuell bei ca. 0,13/100.000 pro Jahr in Europa. Über zwei Drittel der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits ein Alter von über 70 Jahren erreicht [2], [4], [5]. Die drei wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines MCC sind: 1) die Infektion der Tumorzellen mit dem Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV), welches in ca. 80% der Fälle nachgewiesen wird [4]. 2) UV-Exposition, welche das gehäufte Auftreten von MCC an sonnenexponierter Haut im Kopf-Hals-Bereich oder den oberen Extremitäten erklärt. 3) Eine vorbestehende Immunsuppression [1], [6].

Das MCC wächst sehr schnell und präsentiert sich bei Diagnosestellung meist als intrakutaner, solitärer, 1-4 cm großer, schmerzloser, derber Knoten violett-rötlicher

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Merkelzellkarzinoms – nach der Union Internationale Contre le Cancer (7. Edition) [7]

T	Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
	T0	kein Primärtumor gefunden
	Tis	Primärtumor in situ
	T1	Primärtumor bis 2 cm
	T2	Primärtumor über 2 - <5 cm
	T3	Primärtumor ab 5 cm
	T4	Primärtumor infiltriert umgebende Strukturen
N	Nx	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
	N0	Keine Lymphknotenmetastasen
	N1	Regionale Lymphknotenmetastase nachweisbar
	N1a	- Lymphknoten-Mikrometastase: nur mikroskopisch nachweisbar
	N1b	- Lymphknoten-Makrometastase: klinisch nachweisbar
	N2	In-Transit-Metastase
M	M0	keine Fernmetastase
	M1	Fernmetastase vorhanden
	M1a	Fernmetastase in Haut, Weichteilen, fernen Lymphknoten
	M1b	Fernmetastase in Lunge
	M1c	alle anderen Fernmetastasen

T = Ausdehnung des Primärtumors
N = Status regionaler Lymphknoten
M = Status Fernmetastase

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Merkelzellkarzinoms – nach der Union Internationale Contre le Cancer (7. Edition) [7]

Klinisches Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	pN0	M0
IB	T1	cN0	M0
IIA	T2/3	pN0	M0
IIB	T2/3	cN0	M0
IIC	T4	N0	M0
IIIA	jedes T	N1a	M0
IIIB	jedes T	N1b/N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1
T = Ausdehnung des Primärtumors N = Status regionaler Lymphknoten M = Status Fernmetastase			
p = pathologisch c = klinisch			

Farbe und glänzender Oberfläche. Es neigt zu postoperativen Lokalrezidiven und weist sowohl eine hohe und frühzeitige lymphogene als auch eine häufige hämatogene Metastasierungsrate auf. Überdurchschnittlich häufig treten bei Patienten mit MCC auch andere Tumoren der Haut auf (z.B. malignes Melanom (MM), Plattenepithelkarzinom, Basalzellkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom) [3], [8], [9].

Die TNM-Klassifikation (*Tabelle 1*) und Stadieneinteilung (*Tabelle 2*) des MCC erfolgte durch die *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* [7] – 2018 veröffentlichte die UICC eine geringfügig überarbeitete Stadieneinteilung.

I.2 Diagnostik, Prognose, Therapie und Metastasierung des MCC

Zur eindeutigen Diagnosestellung des MCC erfolgt die immunhistochemische Färbung u.a. mit Zytokeratin 20 (CK20) und SYN, um den neuroendokrinen Ursprung des Tumorgewebes zu bestätigen. In Fällen, bei denen eine eindeutige Zuordnung dennoch nicht gelingt, kann der Nachweis von MCPyV die Diagnose sichern [10], [11]. Zu vollständiger Diagnostik und Staging gehören außerdem eine Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB) und bilddiagnostische Verfahren [2], [4].

Die Prognose des MCC hängt maßgeblich vom Stadium bei der Erstdiagnose ab. Patienten mit Primärtumoren <2 cm Durchmesser haben eine Fünfjahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 69%, welche bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen 39% und bei Fernmetastasen nur 18% beträgt. Von prognostischer Relevanz sind zudem Mitoserate, histologischer Typ, und Immunkompetenz des Patienten [9].

Aktuell umfasst die Therapie des MCC eine operative R0-Resektion des Primärtumors mit Sicherheitsabstand von 2 cm und die SLNB sowie eine adjuvante Bestrahlung des

Tumorbetts, ggf. mit der regionären Lymphabflussregion [12]. Bei Patienten mit metastasiertem MCC steht die Chemotherapie mit einem Platinpräparat und Etoposid oder Topotecan zur Verfügung [13]. Außerdem wird seit 2017 Avelumab, ein monoklonaler Antikörper gegen Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) als sog. Immun-Checkpoint Blockade eingesetzt [3].

I.3 PD-1/PD-L1-Signalweg

In der Tumorabwehr spielen vor allem die Immunzellen des tumorumgebenden Stromas eine wichtige Rolle. Die Zellen migrieren zum Ort der Tumorentstehung, wo durch die Aktivierung von Lymphozyten eine spezifische Immunreaktion ausgelöst wird. Diese soll in der Elimination der entarteten Zelle gipfeln. Jedoch gelingt dies nicht, wenn durch chemische Botenstoffe die Immunzellfunktion unterdrückt wird [14]–[16]. Einer dieser Mechanismen ist die Aktivierung des Signalwegs von Programmed cell death protein 1 (PD-1) und seinem Liganden PD-L1.

Um das Gleichgewicht des Immunsystems zu erhalten, muss der Organismus sowohl körpereigene Antigene tolerieren als auch fremde erkennen und eliminieren. Ein wichtiger Baustein zur Ausführung dieser Aufgabe sind „Kontrollpunktproteine des Immunsystems“ (engl.: Immune Checkpoint Proteins), welche die Abwehrreaktion steigern oder einschränken können. Ein Mechanismus der Tumorzellen dem Immunsystem zu entkommen besteht darin, diese Immun-Kontrollpunkte auszuschalten, um sich der Elimination durch Immunzellen des Tumorstromas zu entziehen [17]. Eine der wichtigsten Achsen hierfür ist die Bindung von PD-L1 an den Rezeptor PD-1. Ferner kann auch Programmed cell death protein 1 ligand 2 (PD-L2) an PD-1 binden, jedoch ist vor allem PD-L1 in die Tumorimmunevasion involviert [17]. Sowohl PD-1 als auch PD-L1 sind unter anderem auf der Oberfläche von aktivierten antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, dendritischen Zellen (DZ) und aktivierten T-Zellen zu finden [18]. Sie sind Teil eines komplexen Netzwerks von inhibierenden oder stimulierenden Ko-Transmittern, welches die Kommunikation zwischen Immunzellen ermöglicht. Die Balance innerhalb dieses Netzwerks schützt gleichzeitig den Organismus vor schädlichen Einflüssen und ermöglicht Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen [19], [20]. Nach der Bindung von PD-L1 an PD-1 wird in der T-Zelle ein ko-inhibitorisches Signal ausgelöst, das die Kommunikation zwischen den Immunzellen und die T-Zell-Proliferation unterbindet – die Immunreaktion wird gehemmt. Mäuse, deren Immunzellen nicht die Fähigkeit besitzen PD-1 zu exprimieren, bei denen also dieser Mechanismus der Immunzellhemmung nicht aktiviert ist, entwickeln Erkrankungen wie Arthritis oder Glomerulonephritis auf dem Boden einer anhaltenden Autoimmunentzündung. Eine übermäßige PD-1-Aktivierung wiederum verhindert eine effektive Immunabwehr und

ermöglicht Karzinomen mit hoher PD-L1 Expression, der Apoptose zu entgehen [19], [21].

Arzneimittel, die den PD-1/PD-L1-Signalweg blockieren, verstärken die tumorabwehrende Aktivität und Effektivität der Immunzellen [22]. Sowohl PD-1- als auch PD-L1-Inhibitoren werden heute in der Immuntherapie fortgeschrittener, solider Tumoren wie dem malignen Melanom, dem Hodgkin-Lymphom und dem Blasenkarzinom eingesetzt [17]. Der PD-L1-Inhibitor Avelumab hatte in einer klinischen Phase 1 Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren anderer Entitäten gute Wirksamkeit und Verträglichkeit gezeigt [23]. Durch die Untersuchungen von Lipson et al. [22] wurde bestätigt, dass PD-L1 auch auf Tumorzellen des MCC, sowie auf den tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) exprimiert wird. Vergleichbare Beobachtungen machten Mitteldorf et al. [15], die zusätzlich CD33 positive, PD-L1-exprimierende Zellen im Tumorstroma nachwiesen. Vor diesem Hintergrund wurde die klinische Testung einer Inhibition des PD-L1/PD-1-Signalwegs mittels dem PD-L1-Inhibitor Avelumab bei Patienten mit MCC durch die JAVELIN 200 Studie initiiert. Aufgrund der Erfolge, welche die Therapie erzielte, wurde Avelumab 2017 im Rahmen einer „Orphan Drug Designation“ als Medikament gegen seltene Krankheiten für die Therapie von Patienten mit metastasiertem MCC in Europa zugelassen [3], [24]. Jedoch profitieren nur 33% der Patienten von dem Arzneimittel [25]. Deshalb, und auch um diesen vielversprechenden neuen Therapieansatz weiterzuentwickeln, sind weitergehende Untersuchungen dieser Zielmoleküle beim MCC sinnvoll.

I.4 NGF/TrkA/p75-Signalweg

Ebenfalls gegenwärtig Gegenstand medizinischer Forschung ist die Interaktion von Nerve Growth Factor (NGF) mit den Rezeptoren Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) und Neurotrophinrezeptor p75 (p75) da viele solide Tumoren, darunter Mamma-, Ovarial-, Lungen- und Prostatakarzinom sowie- Karzinome des Gastrointestinaltrakts eine Dysregulation der beteiligten Moleküle dieses Signalwegs aufweisen können [26], [27].

NGF gehört zu den Neurotrophinen, einer Gruppe von Botenstoffen, die in Säugetieren essentiell für die Entstehung und das Funktionieren des Nervensystems sind [28], [29]. Es wird in Zellen des Immunsystems wie den Lymphozyten, aber auch in Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten produziert [30]. Die Bindung von NGF an seine Rezeptoren, welche auf Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie endokrinen Zellen und Immunzellen lokalisiert sind, führt zur Zellproliferation, Differenzierung und Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion, aber auch zur Apoptose der Zelle [31]. Die beiden Rezeptoren von NGF sind TrkA und p75. TrkA wird

ausschließlich durch NGF aktiviert und gilt deshalb als Rezeptor hoher Affinität, während p75 auch durch andere Neurotrophine aktiviert werden kann [28], [31]. Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungsweise in neuronalem Gewebe, darunter auch in der Entstehung von Schmerzreizen, ist der NGF/TrkA/p75-Signalweg im gesunden Gewebe starken Regulationsmechanismen unterlegen [29]. Es gibt ferner einige Hinweise dafür, dass NGF für die Entstehung neuroendokriner Drüsen essentiell ist und in der Hypophyse zur Freisetzung endokriner Hormone führt [32], [33].

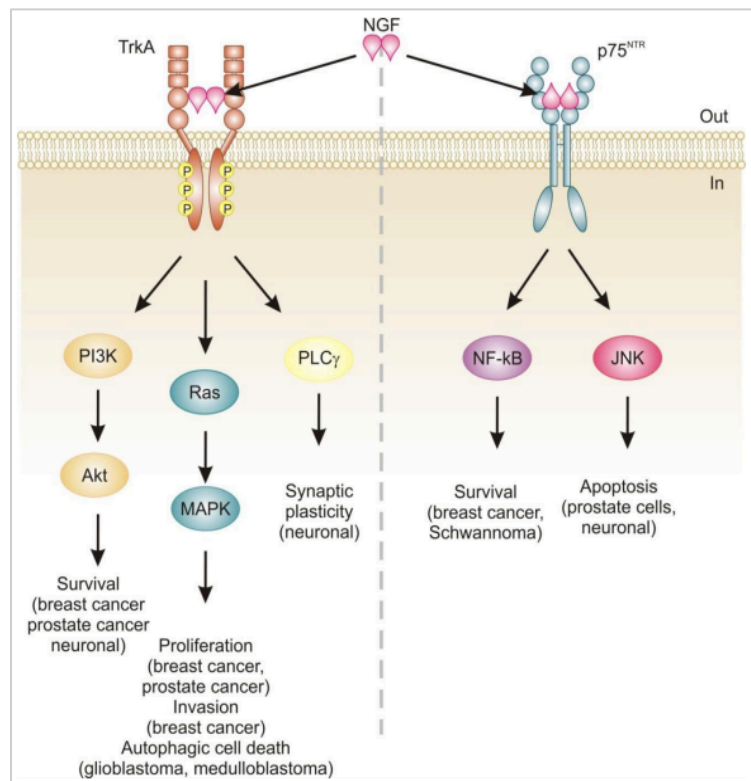


Abbildung 1: Der NGF/TrkA/p75-Signalwegs nach Molloy et al. [41] – Die durch Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) vermittelten Überlebens- bzw. Proliferationssignale, welche auf die Bindung von Nerve Growth Factor (NGF) folgen, konnten bei vielen soliden Tumorentitäten nachgewiesen werden. Sie basieren auf der Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und G-protein-Ras (Ras). In Neuronen wird durch die Aktivierung von Neurotrophin p75 (p75) die Apoptose induziert. Beim Mammakarzinom jedoch führt die Bindung von NGF an p75 zu einem durch Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells- (NF-κB-) vermittelten Überlebenssignal.

Im Hinblick auf onkologische Fragestellungen wurde nachgewiesen, dass Effektormoleküle dieses Signalwegs beispielsweise beim Mamma-, Ovarial- [34], Lungen- und dem kolorektalen Karzinom [35] eine tumorbegünstigende Rolle einnehmen (Abbildung 1). NGF kann sowohl von T-Zellen als auch von Tumorzellen produziert und sekretiert werden [26], [36]. NGF bindet an seinen Rezeptor TrkA auf den benachbarten Immunzellen, induziert eine Entzündungsreaktion sowie die Proliferation von Endothelzellen und regt so die Angiogenese an. Diese ist für das Tumorwachstum und seine Progression unerlässlich [31], [37], [38]. TrkA Genfusionsmutationen, die zur

Überaktivität der Kinase führen [39], können im Sinne eines Protoonkogens [26] durch die antiapoptotische und progressive Wirkung zur karzinomatösen Entartung der Zelle und Metastasierung führen [40]. Die Rolle von p75 in der Zelle ist vielschichtig. Es interagiert mit zahlreichen intrazellulären Proteinen. Die Bindung von NGF an p75 kann in der Zelle sowohl ein Apoptose- als auch ein Überlebenssignal auslösen [41]. Die Wirkungsweise von p75 ist deshalb abhängig vom Zellstatus und den weiteren beteiligten Molekülen zu beurteilen.

Klinische Studien mit TrkA-Inhibitoren weisen auf eine vielversprechende Antitumor-Aktivität bei Karzinompatienten hin [39], [42]. Prada et al. [27] testeten kürzlich den panTrk-Inhibitor GNF-5837 an Zellreihen verschiedener neuroendokriner Karzinome. Bei GOT-1 Dünndarmkarzinoidzellen, welche TrkA exprimierten, konnte ein tumorinhibierender Effekt durch GNF-5837 nachgewiesen werden. Zu der Expression von NGF, TrkA und p75 auf Tumorzellen des MCC oder den Zellen des peritumoralen Stromas wurden bis zum Zeitpunkt des Studienbeginns keine Daten publiziert. Es ist von großem Interesse, ob auch hier eine vermehrte Expression der Effektormoleküle des NGF/TrkA/p75-Signalwegs nachzuweisen ist, was auf eine Beteiligung bei der Tumorgenese hindeuten könnte.

I.5 Fragestellungen der Arbeit

1. Exprimieren MCC-Tumorzellen oder peritumorale Stromazellen PD-1 und PD-L1 und ist die Expression mit Ergebnissen vorangegangener Studienergebnisse vergleichbar?
2. Exprimieren MCC-Tumorzellen oder peritumorale Stromazellen NGF, TrkA und p75?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression der Marker und dem Überleben?
4. Lässt sich durch die Ergebnisse eine Hypothese über die Wirkbeziehung der Zellen zueinander ableiten?
5. Lassen sich neue Zielmoleküle identifizieren, die für eine zielgerichtete- oder eine Immun-Checkpoint-Therapie in Frage kommen?

II. Patienten, Material und Methoden

Zunächst wurden die patientenbezogenen Daten zum Krankheitsverlauf aller in die Studie eingeschlossenen Patienten zusammengetragen und ausgewertet. Daraufhin wurden Gewebeschnitte der Primärtumoren hergestellt und zur Diagnosebestätigung auf die Expression von CK20, SYN und MCPyV getestet. Es folgte die Färbung mit den Antikörpern gegen: NGF, TrkA, p75, PD-1 und PD-L1 (die Verdünnungen der Antikörper und Produktdaten können in Tabelle 3 nachvollzogen werden). Außerdem wurde zusätzlich eine Standardfärbung mit einem CD68-Antikörper durchgeführt, um Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zuordnen zu können. Anschließend wurden die Ergebnisse der Gewebefärbungen mit den Überlebensdaten der Patienten verglichen und statistisch ausgewertet.

Tabelle 3: Übersicht der in der Untersuchung verwendeten Antikörper zur Färbung der Merkelzellkarzinombiopsien

Antigen	Typ	AK-Dilut.	Produktdaten
MCPyV	monoklonal Maus	1:50	Santa Cruz Biotechnology CM2B4, Dallas, USA
TrkA	monoklonal Kaninchen	1:200	Abcam ab76291, Cambridge, UK
p75	monoklonal Kaninchen	1:100	Abcam ab52987, Cambridge, UK
NGF	monoklonal Kaninchen	1:200	Abcam ab52918, Cambridge, UK
PD1	monoklonal Kaninchen	1:50	CellSignaling, Danvers, USA
PD-L1	monoklonal Kaninchen	1:75	E1L3N, CellSignaling, Danvers, USA
AK-Dilut. = Antikörper-Verdünnung MCPyV = Merkelzell-Polyomavirus p75 = Neurotrophinrezeptor p75		NGF = Nerve Growth Factor PD-1 = Programmed cell death protein 1 PD-L1 = Programmed cell death 1 Ligand 1	

II.1 Patientenkollektiv, Untersuchungsmaterial und Datenerhebung

Die Durchführung der vorliegenden Studie wurde durch die institutionelle Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt. Es konnten 55 Patienten mit MCC identifiziert werden, die in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Kiel im Zeitraum von 2010 bis 2016 behandelt wurden. Aus dem Kollektiv konnten 39 Fälle in die Studie eingeschlossen werden, während dies bei den übrigen 16 aus folgenden Gründen nicht möglich war:

- Fehlende/verweigerte Einverständniserklärung durch den Patienten
- Fehlende/verweigerte Einverständniserklärung durch Angehörige
- Ermittlung des Aufbewahrungsstandorts der Biopsie nicht möglich

Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Biopsien der Primärtumoren wurden, nach Einholung der Einwilligung der Patienten oder im Fall eines verstorbenen Patienten durch die des nächsten Angehörigen, durch auswärtige pathologische Praxen an das dermatologische Institut in Kiel übersandt.

Der Status einzelner immunhistochemischer Marker innerhalb der Primärtumoren konnte anhand der externen histopathologischen Befunde retrospektiv erhoben werden. Zusätzlich wurde die Diagnose mithilfe immunhistochemischer Färbungen der Marker CK20, SYN und MCPyV durch das Institut für Pathologie des UKSH Kiel erneut bestätigt oder gegebenenfalls ergänzt.

Außerdem wurde ein Datenerhebungsbogen (s. *Anhang 1*) erstellt, der alle relevanten Patientendaten und Krankheitsverläufe umfasst, darunter Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Datum der Erstdiagnose, Tumorlokalisation, Tumorstadium, Metastasierungsstatus, Therapie und Sterbedatum, sowie Todesursache. Die Erfassung der Patientendaten und Krankheitsverläufe erfolgte anhand der Krankenakten des UKSH Campus Kiel und durch telefonische Befragung der Patienten oder deren Angehörige, sowie durch Befragung der auswärtig behandelnden Ärzte.

Nicht alle Datenerhebungsbögen konnten vollständig ausgefüllt werden, da die Informationen über die Patienten retrospektiv erhoben wurden und nicht alle relevanten Informationen von den behandelnden Ärzten erfasst worden waren. Von einem verstorbenen Patienten war es darüber hinaus nicht möglich, Angehörige ausfindig zu machen, sodass eine Akteneinsicht durch den damals behandelnden Hausarzt nicht gestattet werden konnte.

II.2 Laborchemische Methoden

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie UKSH Kiel wurden vorerst Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte von allen Proben angefertigt und daraufhin mikroskopisch vom Leiter des Instituts für Pathologie, Herrn Prof. Dr. C. Röcken, erneut auf das Vorhandensein von Tumorgewebe überprüft. Die Färbungen mit den Antikörpern gegen CK20, SYN, CD68 und PD-1 wurden in der Routinediagnostik des Instituts für Pathologie des UKSH Kiel automatisiert durchgeführt, während die Färbungen gegen Anti-MCPyV, PD-L1, -NGF, -TrkA und -p75 manuell immunhistochemisch durchgeführt wurden.

Zunächst wurde anhand einiger Probeschnitte getestet mit welcher Konzentration des jeweiligen Antikörpers das beste Färbeergebnis erzielt werden konnte, sodass die Präparate weder zu schwach gefärbt noch überfärbt waren. Für jeden Antikörper wurde eine individuelle Verdünnung, die zum besten Färbeergebnis führte, gewählt (*Tabelle 3*).

Zur Herstellung der Gewebeschnitte des Studienkollektivs wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms 2 µm dünne Schnitte angefertigt, die zunächst in ein Wasserbad transferiert und dann auf Objektträger aufgebracht wurden. Anschließend wurden die Schnitte im Trockenschrank bei 54 °C über Nacht getrocknet. Die so gewonnenen Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert, was durch ein 15-minütiges Xylolbad mit darauffolgender Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe erreicht werden konnte. Im darauffolgenden Schritt wurde zur Vorbehandlung und Antigendemaskierung der formalinfixierten Gewebeschnitte eine Behandlung im Dampfdrucktopf bei 125 °C für eine Minute in einer Citratpuffer-Wasser-Lösung (Verhältnis 1:9) durchgeführt. Anschließend folgte ein kurzes Abkühlen der Objektträger unter fließendem Leitungswasser, sowie in Tris-Kochsalz-Puffer-Lösung (TBS). Zur Verringerung nicht-spezifischer Hintergrundfärbung wurde nun ein Wasserstoffperoxid-Block (UltraVision Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) für 15 Minuten und nach erneuter Spülung in TBS ein Protein-Block (UltraVision Protein Block, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) für 5 Minuten aufgetragen und jeweils bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülung in TBS folgte dann die eigentliche Färbung mit dem jeweiligen primären Antikörper, der in Diluent (Antibody-Diluent, Zymed, Wien, Österreich) verdünnt auf die vorbehandelten Gewebeschnitte aufgetragen und über Nacht bei 4-8 °C inkubiert wurde.

Am nächsten Tag folgte auf erneutes Spülen in TBS die Applikation eines peroxidasemarkierten Universalantikörpers (ImPRESS HRP Universal Anti-MOUSE/RABBIT Ig, Vectorlabs, Peterborough, Großbritannien). Zur Darstellung der gebundenen Antikörper wurde Novared (ImmPACT Vector Red, Vectorlabs, Peterborough, Großbritannien) als Substrat aufgetragen und nach 5-minütiger Inkubation mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Kontrastierung der Kerne wurden die Schnitte dann eine Minute in ein Hämalunbad getaucht und 10 Minuten mit fließendem, warmem Leitungswasser gebläut. Nach der anschließenden Dehydrierung bis zum Xylol folgte die Eindeckelung der gefärbten Schnittproben.

II.3 Auswertung

Um qualitativ hochwertige Ergebnisse gewährleisten zu können, wurde die mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte durch erfahrene Dermatopathologinnen der Klinik für Dermatologie des UKSH Kiel, Frau Prof. Dr. F. Egberts und Frau Dr. Ulrike U. Wehkamp, sowie dem Leiter des Instituts für Pathologie, Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken, durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden visuell ausgewertet. Das Ausmaß der peritumoralen Infiltration von Entzündungszellen wurde bewertet und jeweils als dicht, mitteldicht oder gering eingestuft. Außerdem wurde die Expression der

Antikörper auf den Tumorzellen selbst, sowie auf den umgebenden Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen bewertet. Einige Gewebeschnitte konnten nicht ausgewertet werden, was beispielsweise der Fall war, wenn kein Tumorgewebe im Paraffinblock mehr übrig war. Oder wenn das Färbeergebnis bei einzelnen Proben nicht eindeutig genug war, sodass die Antikörperexpression weder als positiv noch als negativ bewertet werden konnte. Die Anzahl der auswertbaren Gewebeschnitte ist in den Ergebnissen angegeben.

II.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung und Anfertigung der Graphen erfolgte mit der Graph Prism Software (Version 7, GraphPad, LaJolla, USA). Die ermittelten Patientendaten wurden im Excel-Programm tabellarisch dargestellt und in das Programm übertragen.

Der Vergleich der Untergruppen wurde mit dem zweiseitigen T-Test durchgeführt. Die Korrelationsanalyse erfolgte durch die Anwendung des exakten Tests nach Fisher und des Chi-Quadrat-Tests. Die Korrelationsanalyse zwischen den Immunfärbungen wurde für wiederholte Testungen korrigiert. Wahrscheinlichkeiten wurden als signifikant gewertet, wenn der p-Wert $<0,05$ lag.

Die Überlebenszeitanalyse wurde mit der Kaplan-Meier-Berechnung durchgeführt. So konnten Überlebenskurven in Bezug auf die Expression bzw. die Nicht-Expression der getesteten Marker und des Gesamt- sowie des krankheitsspezifischen Überlebens erstellt werden. Das Beobachtungsende richtete sich hier nach dem Ende unserer Datenerhebung, wobei die Informationen über das Patientenüberleben zum spätestmöglichen Zeitpunkt erhoben wurden.

III. Ergebnisse

III.1 Patientendaten

Durch die Auswertung der Datenerhebungsbögen der Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, ergaben sich zunächst folgende Ergebnisse.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 21 weiblichen Patienten (54%) und 18 männlichen Patienten (46%) zusammen, die einen Altersdurchschnitt von 75 Jahren mit einer Altersspanne von 58-88 Jahren aufwiesen (*Tabelle 4*).

<i>Tabelle 4: Geschlecht und medianes Alter des Patientenkollektivs</i>				
MERKMAL		ANTEIL	abs.	(%) / [Range]
Geschlecht n=39 (100%)	Weiblich		21	(54)
	Männlich		18	(46)
Medianes Alter [Range] (n=39)	Total		75,0	[58-88]
	Weiblich		75,2	[58-88]
	Männlich		75,0	[63-88]

Bei 90% der Patienten (35/39) war der Primärtumor am Kopf bzw. Hals oder an den Extremitäten lokalisiert. Bei 3 Patienten (8%) war der Primärtumor am Rumpf lokalisiert. Von 33 der 39 Patienten konnte der Durchmesser des Primärtumors ermittelt werden. In 18/33 Fällen (55%) war dieser kleiner als 2 cm und in 15/33 Fällen (45%) zwischen 2 und 5 cm. Die Daten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Eines von 39 Präparaten konnte bezüglich seiner MCPyV-Expression nicht ausgewertet werden, jedoch gelang eine eindeutige Auswertung bei den 38 übrigen Präparaten. MCPyV wurde bei 32/38 Biopsien (84%) nachgewiesen, wohingegen 6/38 Biopsien (16%) negativ waren (*Tabelle 6*). Ferner bestand bei 3/39 Patienten (8%) zum

<i>Tabelle 5: Tumorlokalisation und Durchmesser des Primärtumors</i>				
MERKMAL		ANTEIL	abs.	(%)
Tumorlokalisation (n=38)	Kopf / Hals		14	(37)
	Extremitäten		21	(55)
	Rumpf		3	(8)
Tumordurchmesser in cm (n=33)	<2		18	(55)
	2-5		15	(45)
	>5		0	

<i>Tabelle 6: Nachweis von Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) im Tumor</i>			
MERKMAL	ANTEIL	abs.	(%)
Nachweis von MCPyV im Tumor (n=38)	positiv	32	(84)
	negativ	6	(16)

Zeitpunkt der Diagnosestellung eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems. Bei 42% der Patienten (16/38) waren weitere Neoplasien bekannt, welche häufig von

der Haut ausgingen, darunter das MM, das Plattenepithel- und Basalzellkarzinom, sowie gutartige Hauttumoren. Bei 23 der 39 Patienten war laut Patientenakte eine SLNB durchgeführt worden und in 6/23 Fällen (26%) lag der Nachweis von Mikro- oder Makrometastasen in den Sentinel-Lymphknoten vor. Bei 38 Patienten konnte der Fernmetastasierungsstatus zum Zeitpunkt der Datenerhebung festgestellt werden. Ein Patient (3%) wies eine Fernmetastase in der Haut auf, bei 13/38 Patienten (34%) befanden sich diese in Lymphdrüsen ferner Lymphknotenstationen und in 4/38 Fällen (11%) hatte der Tumor bereits Metastasen in anderen Organen gebildet. Die Daten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Abschließend wurde der zum Zeitpunkt der Datenerhebung erreichte TNM-Status der Patienten nach der zu diesem Zeitpunkt aktuellen Auflage der UICC-Klassifikation maligner Tumoren [7] bestimmt (Tabelle 8). Der T-Status wird durch den Tumordurchmesser definiert. Bei manchen Patienten wurden Lymphknotenmetastasen (N-Status) nachgewiesen. Mikrometastasen lagen bei 4/39 Patienten (10%), Makrometastasen bei 8 (20%) und eine In-Transit-Metastase lag bei einem Patienten (3%) vor, während 67% der Patienten zu diesem Zeitpunkt metastasenfrei waren. Insgesamt wurden bei 3 Patienten (8%) Fernmetastasen in der Haut oder dem Subkutangewebe nachgewiesen und 4 Patienten (10%) hatten Fernmetastasen in anderen Organen.

Tabelle 7: Zweitmalignom, Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB) und Fernmetastasen				
MERKMAL		ANTEIL	abs.	(%)
Zweitmalignom (n=38)			16	(42)
SLNB positiv (n=23)			6	(26)
Fernmetastasen (n=38)	Haut		1	(3)
	Ferne Lymphknoten		13	(46)
	Organ		4	(11)

Tabelle 8: TNM-Status des Gesamtkollektivs nach UICC-Klassifikation [7], n = 39 (%)													
T-Status						N-Status				M-Status			
Tx	Tis	T1	T2	T3	T4	N0	N1a	N1b	N2	M0	M1a	M1b	M1c
6 (15)	0	18(46)	15 (39)	0	0	26 (67)	4 (10)	8 (20)	1 (3)	32 (82)	3 (8)	0	4 (10)
T: Ausdehnung des Primärtumors, Tx: Primärtumor nicht beurteilbar, Tis: Carcinoma in situ N: Regionale Lymphknotenmetastase M: Fernmetastase													

III.2 Expression von CK20, SYN und MCPyV

Es konnten je 38 von 39 Biopsien auf die Expression von CK20, SYN und MCPyV ausgewertet werden (Abbildung 2). Darunter waren alle 38 (100%) positiv für CK20 und

SYN; 32/38 (84%) waren positiv für MCPyV (Abbildung 3). Die Diagnose des MCC konnte erneut bestätigt werden.

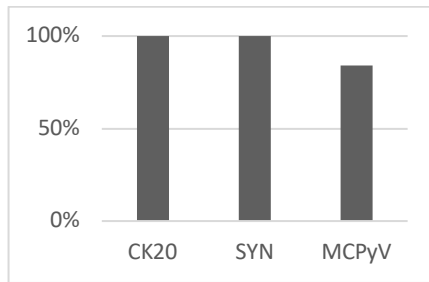


Abbildung 2: Expression von Zytokeratin 20 (CK20), Synaptophysin (SYN) und Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) auf Tumorzellen – Alle Biopsien waren positiv für CK20 und SYN und 84% der Tumorzellen waren positiv für MCPyV.

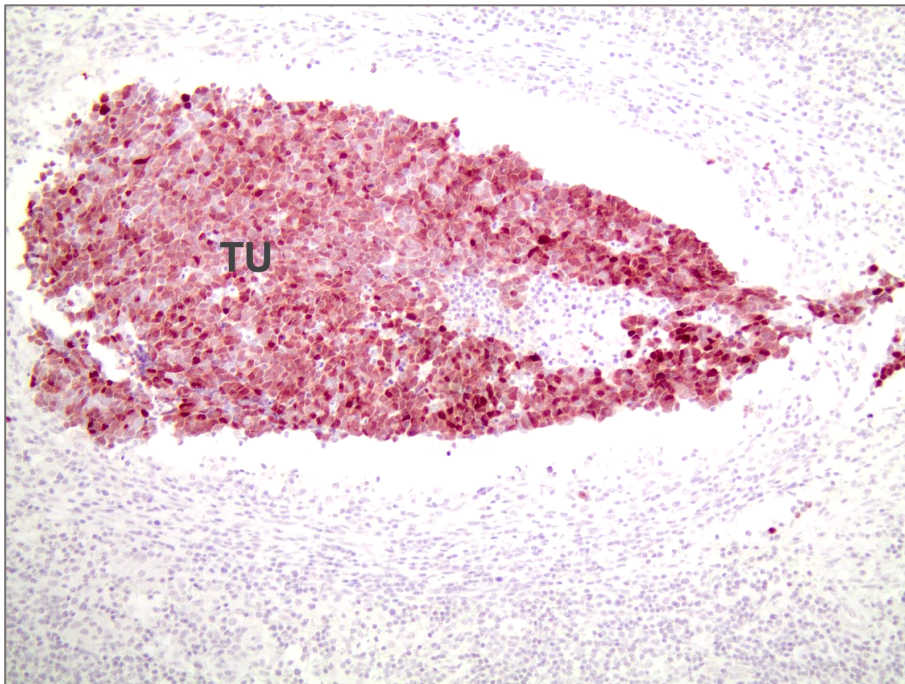


Abbildung 3: Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) auf Tumorzellen – zentral befindet sich ein dichtes Tumorzellkonglomerat (TU). Durch die rötliche Anfärbung wird deutlich, dass fast alle Tumorzellen MCPyV-positiv sind. (Vergrößerung: x200)

III.3 Peritumorale Infiltration von Entzündungszellen, CD68-Expression

Im tumorumgebenden Stroma finden sich entzündliche Infiltrate unterschiedlicher Ausprägung. Zum Teil reichten diese innerhalb von Septen bis in tumortragende

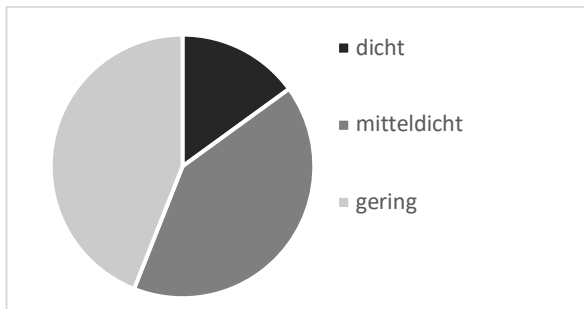


Abbildung 4: Dichte der Infiltration von Entzündungszellen ins Tumorgewebe – Meist war die Entzündungszellinfiltration in den Biopsien gering (44%) oder mitteldicht (41%).

Areale hinein. Die Infiltration von Entzündungszellen war in 6/39 Fällen (15%) dicht, in 16/39 Fällen (41%) mitteldicht und in 17/39 Fällen (44%) gering (*Abbildung 4*). Während der Auswertung der Gewebeschnitte zeigte sich häufig eine auffällige Anfärbung spindelförmiger Zellen im Bereich des Tumorstromas mit den Antikörpern. Für eine bessere Zuordnung der Zellen wurden CD68-Färbungen angefertigt, welche von Zellen monozytischen Ursprungs, u.a. Makrophagen und DZ exprimiert werden. In allen untersuchten Proben waren die spindelförmigen Stromazellen CD68-positiv (*Abbildung 5*).

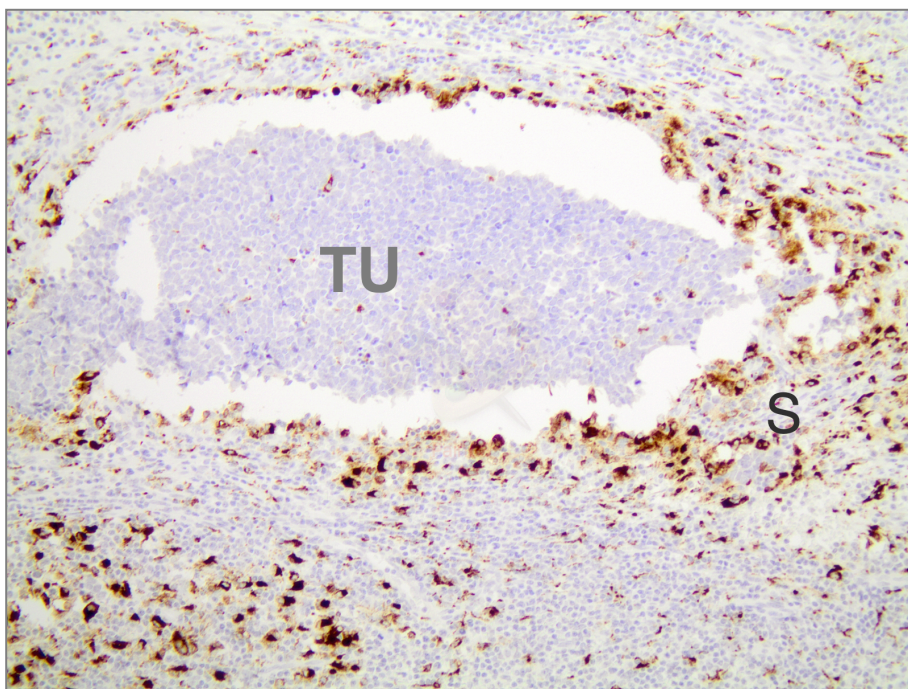


Abbildung 5: Expression von CD68 auf spindelförmigen Stromazellen – Die zentral gelegenen Tumorzellen (TU) werden durch Zellen des Tumorstromas (S) umgeben. Die braune Färbung demaskiert die CD68-positiven, spindelförmigen Zellen, welche wallartig um den Tumor angeordnet sind. (Vergrößerung: x200)

III.4 Expression von PD-1 und PD-L1

Von 39 Proben konnten 35 hinsichtlich der PD-1 Expression ausgewertet werden. Am häufigsten wurde der Marker auf Lymphozyten exprimiert (*Abbildung 6*). In 23/35 Fällen

(66%) konnte eine schwache PD-1-Expression (<5% aller Lymphozyten) nachgewiesen werden (*Abbildung 7*). Die für PD-1 positiven Zellen befanden sich vornehmlich in Bereichen, in denen Tumorgewebe auf umgebendes Stroma oder Septen der infiltrierenden Entzündungszellen traf. Auf Tumorzellen ließ sich PD-1 in 2/35 Proben (6%) nachweisen, jedoch war die Expression in beiden Fällen schwach (<5% aller Tumorzellen) und in einem Fall wurde der Marker nur fokal exprimiert. PD-1 wurde auf tumorumgebenden CD68+ Spindelzellen nicht exprimiert.

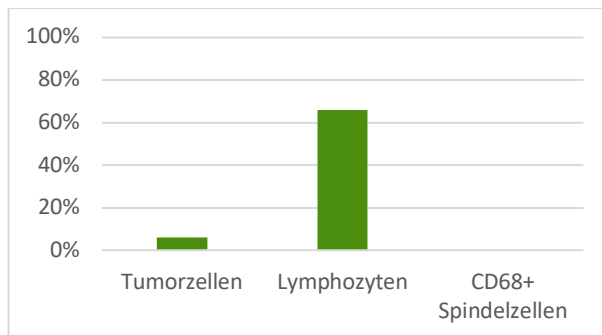


Abbildung 6: Expression von Programmed cell death protein 1 (PD-1) auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen – PD-1 wurde in 66% der Fälle auf Lymphozyten und in 6% der Fälle auf Tumorzellen exprimiert.

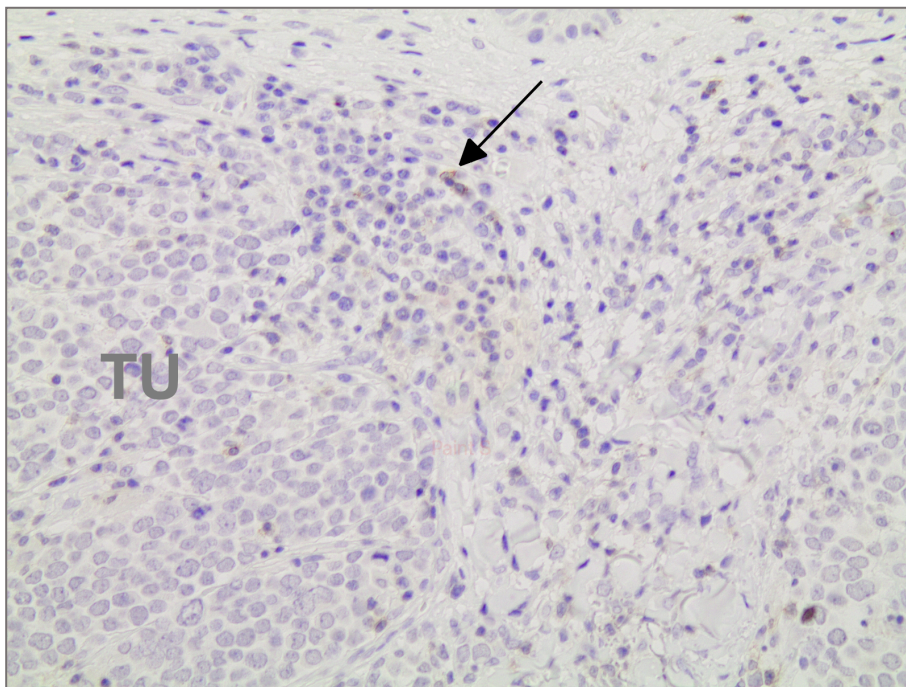


Abbildung 7: Expression von Programmed cell death protein 1 (PD-1) auf Lymphozyten – Die Expression von PD-1 auf Lymphozyten (schwarzer Pfeil) wird durch eine schwache bräunliche Anfärbung sichtbar. Tumor (TU) im linken Unterfeld. (Vergrößerung: x400)

PD-L1

Die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen war positiv, wenn mindestens 1% der Zellen den Marker exprimierten. Von den 37 auswertbaren Proben waren in 16 Fällen (43%) die Tumorzellen positiv für PD-L1 (*Abbildung 8*). Auf Spindelzellen galt die Expression

von PD-L1 als positiv, wenn mindestens 5% der Zellen den Marker exprimierten. 35/37 Proben (95%) waren positiv und erneut zeigte sich eine membranständige Anfärbung in Bereichen, in denen Tumorzellen mit umgebendem Stroma bzw. Septen der infiltrierenden Entzündungszellen in Berührung kamen (Abbildungen 9 und 10). PD-L1 wurde durch tumorumgebende Lymphozyten nicht exprimiert.

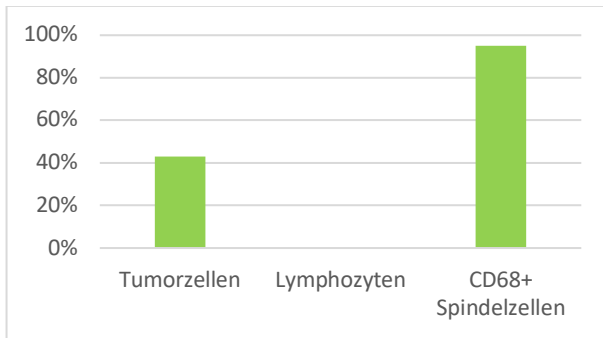


Abbildung 8: Expression von Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) durch Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen – PD-L1 wurde in 43% der Fälle auf Tumorzellen und in 95% der Fälle auf CD68+ Spindelzellen exprimiert.

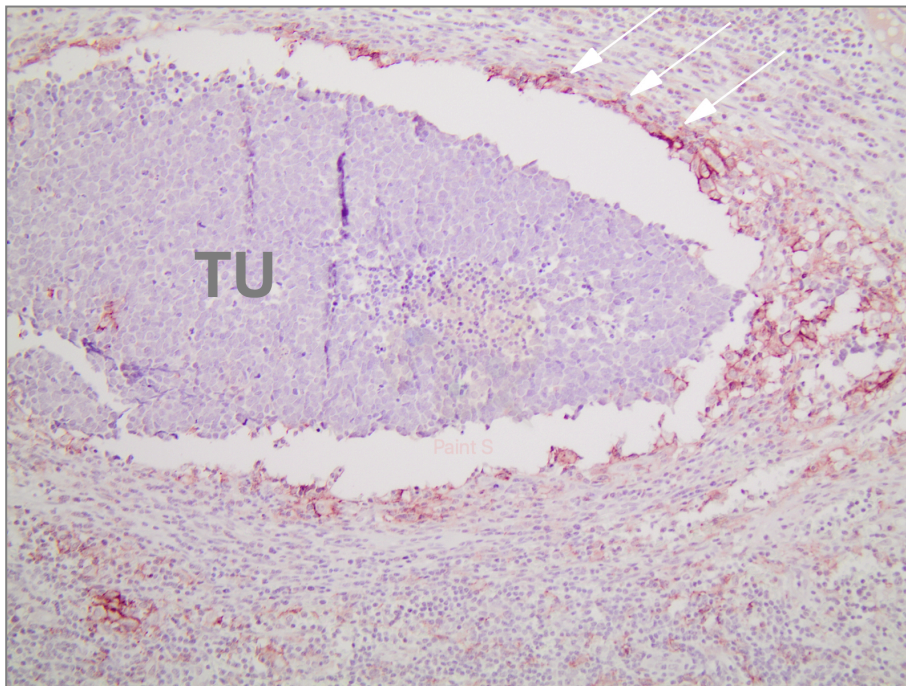


Abbildung 9: Expression von Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) durch CD68+ Spindelzellen – Eine deutliche Expression des Markers lässt sich vor allem auf CD68+ Spindelzellen (weiße Pfeile) nachweisen, welche sich in direkter Nähe zu den Tumorzellen (TU) befinden. (Vergrößerung: x200)

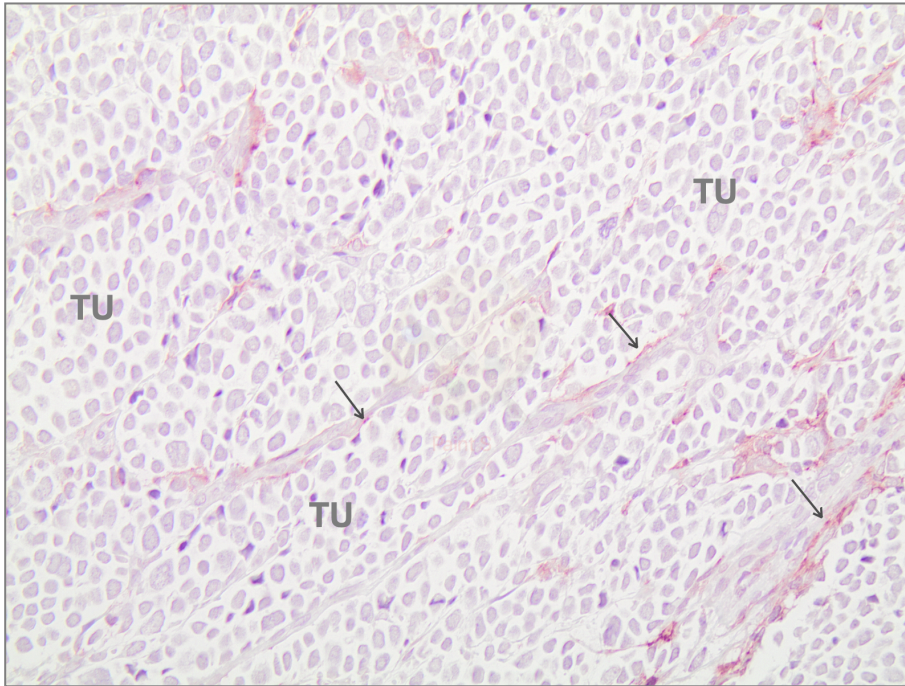


Abbildung 10: Expression von Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) durch CD68+ Spindelzellen – Die rötliche Anfärbung zeigt die PD-L1 Expression durch CD68+ Spindelzellen (graue Pfeile), welche innerhalb septenartiger Stromaausläufer den Tumor (TU) durchziehen. (Vergrößerung: x400)

III.5 Expression von NGF, TrkA und p75

Eine Auswertung von NGF war bei 34 von 39 Proben möglich. In 8/34 Proben (23,5%) waren Tumorzellen positiv für NGF, wenn jene Biopsien gewertet wurden, in denen 10% aller Tumorzellen NGF exprimierten. In 2/34 Proben (6%) wurde NGF auf 10-25% aller Tumorzellen exprimiert und in 6/34 Fällen exprimierten sogar über 50% der Tumorzellen den Marker. Die Expression von NGF auf CD68+ Spindelzellen wurde als positiv gewertet, wenn NGF auf mindestens 5% der Zellen exprimiert wurde. In 24/34 Fällen (71%) konnte NGF nachgewiesen werden (*Abbildung 11*), wobei sich die Anfärbung wiederum membranständig und vor allem im Bereich der Tumor-/Stroma-Grenze oder Tumor-/Septen-Grenze zeigte (*Abbildung 12*).

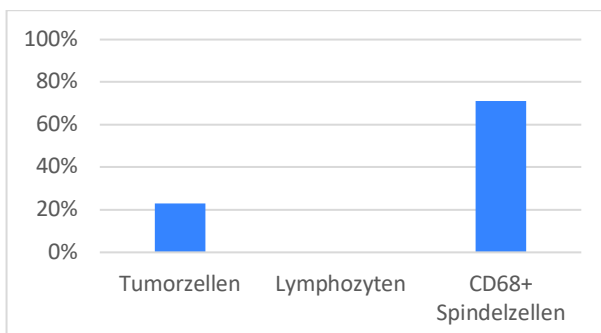


Abbildung 11: Expression von Nerve Growth Factor (NGF) durch Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen – NGF wurde in 23,5% der Fälle auf Tumorzellen und in 71% der Fälle auf CD68+ Spindelzellen exprimiert.

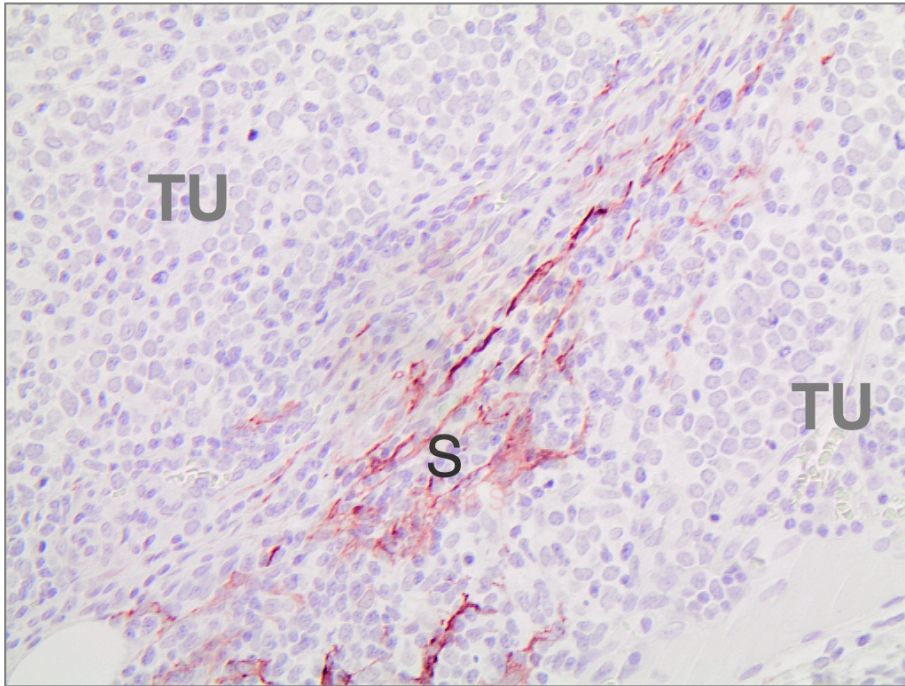


Abbildung 12: Expression von Nerve Growth Factor (NGF) durch CD68+ Spindelzellen – Die deutliche Expression von NGF auf CD68+ Spindelzellen, die als Teil von Stromasepten den Tumor durchziehen, wird durch die rote Anfärbung sichtbar. (Vergrößerung: x400)

TrkA auf Tumorzellen wurde als positiv gewertet, wenn mindestens die Hälfte der Tumorzellen TrkA exprimierten. 36 von 36 auswertbaren Proben (100%) waren positiv für den Marker. Während sich die Expression zu 94% (34/36) schwach zeigte, war sie in 2/36 (6%) der Fälle stark ausgeprägt und zumeist (30/36, 83%) membranständig. Außerdem zeigte sich in jeder Zelle ein exzentrisch gelegener Punkt im Zytoplasma (Abbildung 4). Auf CD68+ Spindelzellen wurde TrkA in 33/36 Gewebeschnitten (92%) exprimiert. Es zeigte sich eine starke TrkA-Expression in 30/36 Fällen (83%), während 3/36 Proben (8%) eine schwache Färbung aufwiesen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse siehe Abbildung 13.

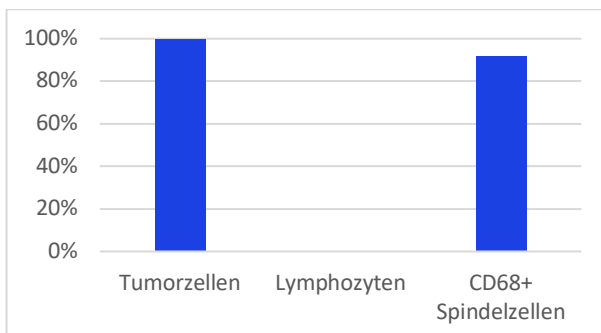


Abbildung 13: Expression von Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen – TrkA wurde in jeder Probe von den Tumorzellen und in 92% der Fälle auf CD68+ Spindelzellen exprimiert.

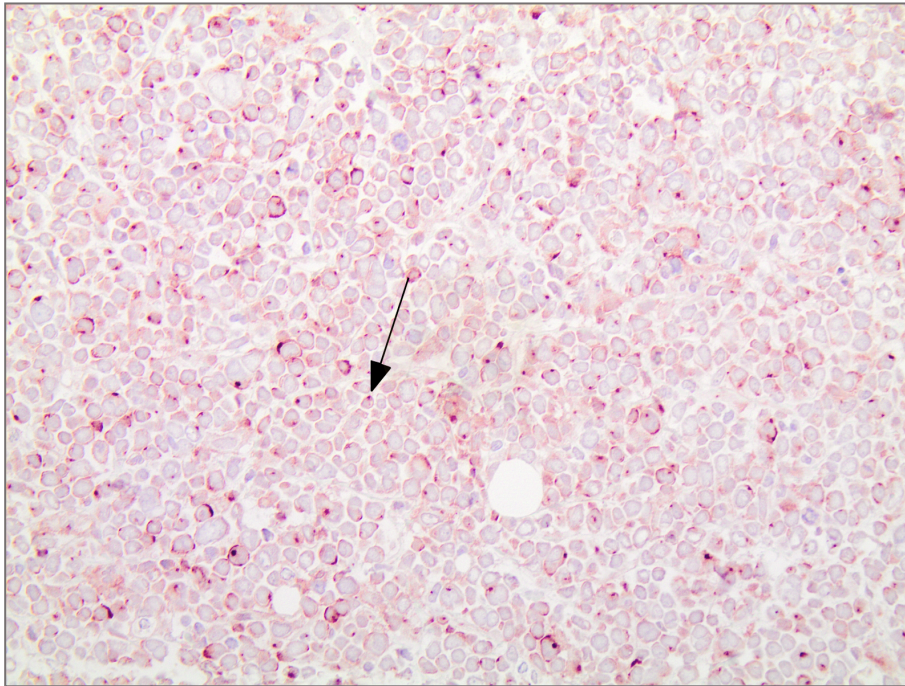


Abbildung 14: Expression von Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) auf Tumorzellen – TrkA-exprimierende Tumorzellen zeigen eine membranständige, rötliche Färbung. Außerdem weisen die meisten Zellen einen exzentrisch gelegenen Punkt im Zytoplasma auf (schwarzer Pfeil). (Vergrößerung: x400)

In 7/36 Fällen (19%) waren die Tumorzellen positiv für p75. Davon zeigten 2/36 Proben (5,5%) eine starke, 2/36 Proben (5,5%) eine fokale und 3/36 Proben (8%) eine schwache Anfärbung für den Marker. Auf CD68+ Spindelzellen konnte p75 in 24/36 Proben (66%) nachgewiesen werden (Abbildung 14). Auf 21/36 Proben (58%) war die Expression stark ausgeprägt, während sie in 3/36 Fällen (8%) schwach war.

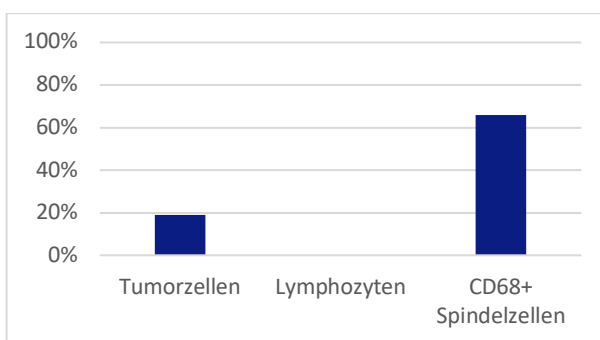


Abbildung 15: Expression von Neurotrophinrezeptor p75 (p75) auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen – p75 wurde in 19% der Fälle auf Tumorzellen und in 66% der Fälle auf CD68+ Spindelzellen exprimiert.

III.6 Zusammenfassende Darstellungen der Ergebnisse

Eine übersichtliche Darstellung der Färbeergebnisse und der Expression von PD-1, PD-L1, NGF, TrkA und p75 auf den verschiedenen Zellentitäten, ist in Abbildung 16 und Abbildung 17 zu sehen.

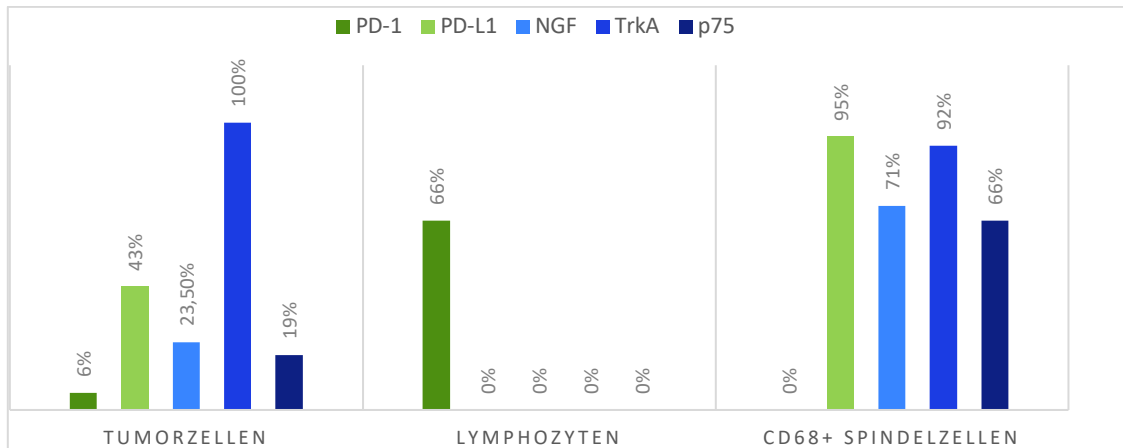


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der Antikörperexpression auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen – Auf den Tumorzellen konnten Programmed cell death protein 1 (PD-1), Programmed cell death protein 1 Ligand 1 (PD-L1), Nerve Growth Factor (NGF), Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) und Neurotrophinrezeptor p75 (p75) nachgewiesen werden. TrkA war sogar in allen Proben (100%) positiv. In 66% der Fälle exprimierten die peritumoralen Lymphozyten PD-1. Kein anderer Marker konnte auf diesen Zellen nachgewiesen werden. Die CD68+ Spindelzellen exprimierten PD-L1, NGF, TrkA und p75 zu unterschiedlichen Anteilen.

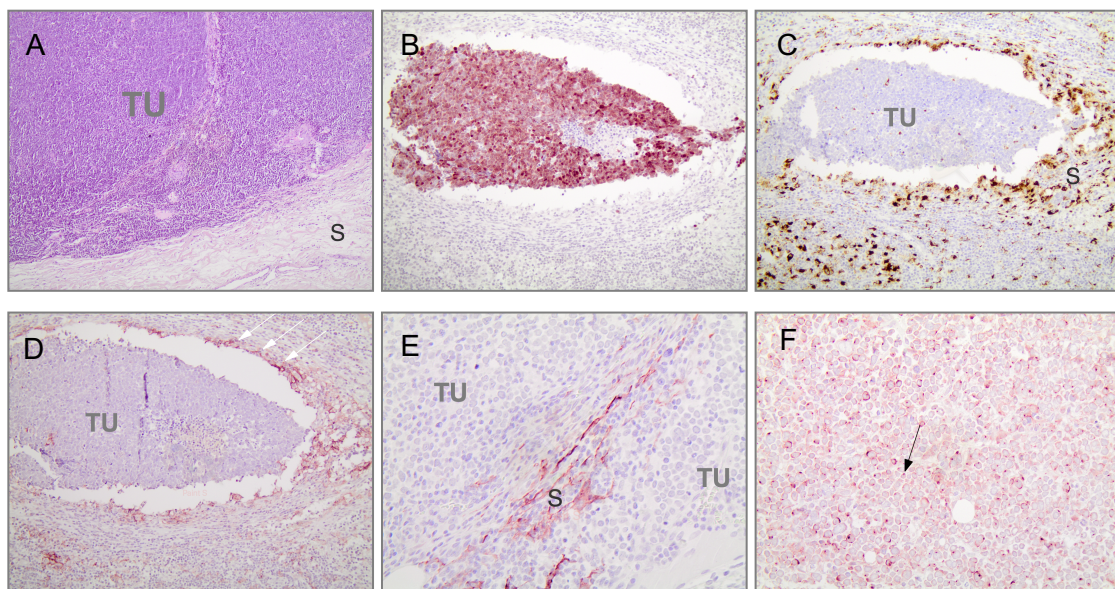


Abbildung 17: Zusammenfassende Darstellung der Antikörperfärbungen – Das Merkelzellkarzinom (TU) ist vom peritumoralen Stroma (S) umgeben (A, H&E), in dem verschiedene Zellentitäten vorzufinden sind. In den meisten Biopsien sind die Tumorzellen positiv für das Merkelzell-Polyomavirus (B). CD68+ Spindelzellen (C), die Programmed cell death protein 1 Ligand 1 (PD-L1) exprimieren (D), sind in direkter Nähe um die Tumorzellen lokalisiert. Häufig exprimieren diese Zellen, die den Tumor septenartig (S) durchziehen, auch Nerve Growth Factor (NGF) (E). Die rote Färbung in Bild F zeigt, dass fast alle Tumorzellen Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) exprimieren.

Spindelzellen exprimierten PD-L1. Der Ligand kann an seinen Rezeptor PD-1, der auf Lymphozyten exprimiert wurde, binden und dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. In allen Biopsien wurde durch die Tumorzellen außerdem der Rezeptor TrkA exprimiert. An diesen kann sein Ligand NGF binden, der in 71% der Fälle durch CD68+ Spindelzellen exprimiert wurde, wodurch in der Tumorzelle wiederum eine Signalkaskade ausgelöst werden kann.

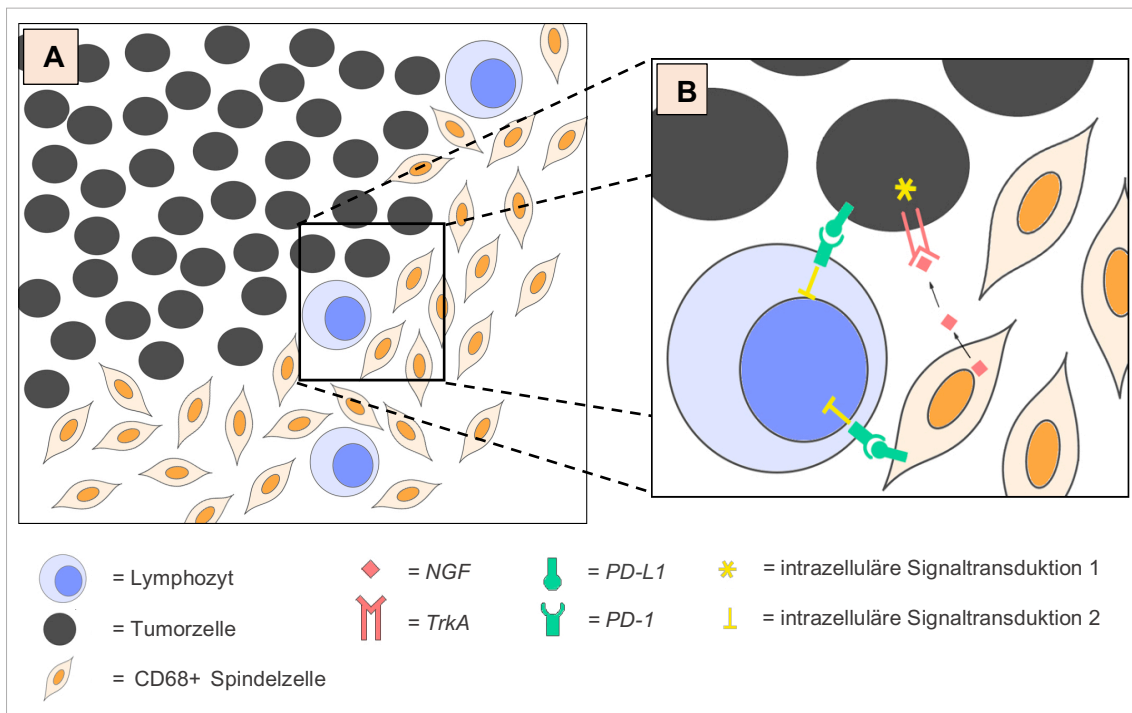


Abbildung 18: Anordnung von peritumoralen Stromazellen zu Tumorzellen und Markerexpression – (A) Die Tumorzellen wurden wallartig von CD68+ spindelförmigen Zellen umgeben. Ferner fanden sich im peritumoralen Stroma Immunzellen wie Lymphozyten. (B) Dargestellt wird die Vergrößerung eines Bildausschnitts aus A:

- Der Rezeptor Programmed cell death protein 1 (PD-1) wurde von Lymphozyten exprimiert. Sowohl die Tumor- als auch die CD68+ Spindelzellen exprimierten den Liganden Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1). Durch die Bindung von PD-L1 an PD-1 wird im Lymphozyten eine Signalkaskade ausgelöst (intrazelluläre Signaltransduktion 1).
- Der Rezeptor Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) wurde auf den Tumorzellen exprimiert, sein Ligand Nerve Growth Factor (NGF) wurde durch CD68+ Spindelzellen exprimiert. Durch die Bindung von NGF an TrkA wird in der Tumorzelle eine Signalkaskade ausgelöst (intrazelluläre Signaltransduktion 2).

III.7 Statistische Auswertung

III.7.1 Korrelationsanalyse

Zunächst wurde die Expression von MCPyV mit der von PD-1, PD-L1, TrkA und NGF verglichen. Einzig die Expression von MCPyV korrelierte mit der von PD-L1 auf Tumorzellen ($p=0,023$). Nach der Korrektur für mehrfaches Testen, war das Ergebnis allerdings statistisch nicht mehr signifikant ($p\geq 0,05$).

III.7.2 Vergleich der Untergruppen

Verglichen wurde die Gruppe von Tumoren, welche PD-1 auf Lymphozyten und NGF auf CD68+ Spindelzellen exprimierten mit jener Gruppe von Tumoren, welche PD-1 und NGF nicht exprimierten.

Dadurch sollten Störfaktoren der Überlebenszeitanalyse ausgeschlossen werden. Bei einer Toleranzgrenze von $p = <0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Berechnungen zeigten ähnliche Verteilungen der Patienten in den einzelnen Untergruppen.

III.7.3 Überlebenszeitanalyse

Zu 37 von 39 Patienten konnten Überlebensdaten gesammelt werden. Verstorben waren zum Zeitpunkt der Nachbeobachtung 22/37 Patienten (59,5%). Bei 15 Patienten (40,5%) wurde der Zeitpunkt der letzten Dokumentation für die Überlebensberechnungen verwendet.

Tabelle 9 Ergebnisdarstellung: Gesamtüberleben und krankheitsspezifisches Überleben

	Medianes Gesamt- überleben [Monate]	Krankheitsspezifisches Überleben nach 30 Monaten [%]
PD-1 auf Lymphozyten	PD-1 (+) 23,2 PD-1 (-) 61,6 $p = 0,35$	PD-1 (+) 67 PD-1 (-) 78 $p = 0,54$
>1% PD-L1 auf Tumorzellen	PD-L1 (+) 24,7 PD-L1 (-) 61,6 $p = 0,86$	PD-L1 (+) 49 PD-L1 (-) 92 $p = 0,059$
NGF auf CD68+ Spindelzellen	NGF (+) 24,7 NGF (-) 29,8 $p = 0,88$	NGF (+) 62,5 NGF (-) 85,7 $p = 0,48$
PD-1: Programmed cell death protein 1 PD-L1: Programmed cell death protein 1 Ligand 1 NGF: Nerve Growth Factor		

Berechnet wurde außerdem das Gesamtüberleben und das krankheitsspezifische Überleben (Tabelle 9) bezüglich PD-1 auf Lymphozyten, PD-L1 auf Tumorzellen ($\geq 1\%$) und NGF auf CD68+ Spindelzellen.

In den Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Abbildung 19) zeigte sich, dass Patienten, bei denen die Tumorzellen PD-L1 exprimierten, tendenziell ein kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen im Gegensatz zu Tumorzellen ohne PD-L1 Expression [PD-L1(+) 24,7 Monaten vs. PD-L1(-) 61,6 Monate; $p=0,86$]. Die Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens nach 30 Monaten war bei PD-L1(+) Patienten ebenfalls schlechter als das bei PD-L1(-) Patienten (49% vs. 92%; $p=0,54$).

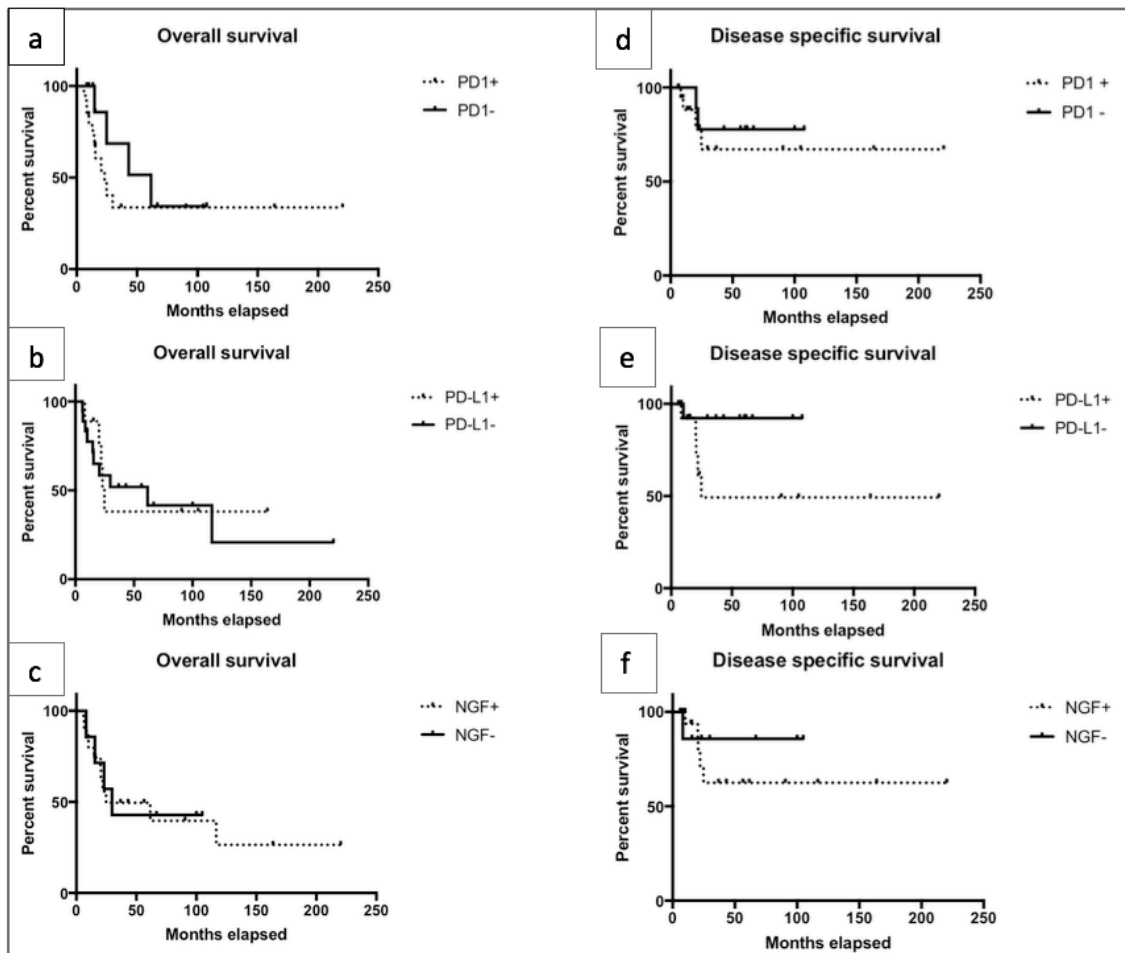


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für medianes Gesamtüberleben und krankheitsspezifisches Überleben in Korrelation zur Expression von Programmed cell death protein 1 (PD-1) auf Lymphozyten (a+d), Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) auf Tumorzellen (b+e) und Nerve Growth Factor (NGF) auf CD68+ Spindelzellen (c+f) – Es zeigt sich die Tendenz eines schlechteren Überlebens bei Patienten, deren Tumorzellen PD-L1 exprimierten (medianes Gesamtüberleben PD-L1(+) 24,7 Monate vs. PD-L1(-) 61,6 Monate). Dasselbe gilt für die Expression von PD-1 auf Lymphozyten (medianes Gesamtüberleben PD-1(+) 23,2 Monate vs. PD-1(-) 61,1 Monate). Ein schlechteres Überleben zeigten ebenso Patienten in deren Biopsien CD68(+) Spindelzellen NGF exprimierten (medianes Gesamtüberleben NGF (+) 24,7 Monate vs. 29,8 Monate). Dieselben Tendenzen spiegeln sich auch im krankheitsspezifischen Überleben wider.

vorhanden waren, ein kürzeres Gesamtüberleben auf als Patienten, bei denen das nicht der Fall war [PD-1(+) 23,3 Monate vs. PD-1(-) 61,6 Monate; $p=0,35$]. Das krankheitsspezifische Überleben nach 30 Monaten betrug 67% bei PD-1(+) Patienten und 78% bei PD-1(-) Patienten ($p=0,059$). Schließlich zeigte die Überlebenszeitanalyse

bezüglich NGF auf CD68+ Spindelzellen ein schlechteres Outcome für NGF(+) Patienten im Gegensatz zu NGF(-) Patienten [NGF(+) 24,7 Monate vs. NGF(-) 29,8 Monate; $p=0,88$]. Das krankheitsspezifische Überleben von NGF(+) Patienten war geringer als das der NGF(-) Patienten [NGF(+) 62% vs. NGF(-) 85,7%; $p=0,48$].

Die statistische Signifikanz war bei keinem der Vergleiche gegeben (alle p-Werte $\geq 0,05$).

IV. Diskussion

Das MCC gehört zu den zwar eher selteneren, jedoch mit einer schlechten Prognose vergesellschafteten malignen Erkrankungen der Haut. Im Falle einer Metastasierung zeigen die klassischen onkologischen lokalen und systemischen Therapieformen unbefriedigende Ergebnisse mit niedrigen Ansprech- und Überlebensraten. Mit der Entwicklung der sog. Immun-Checkpoint-Blockade eröffneten sich neue Möglichkeiten auch in der Behandlung des MCC. Avelumab wird in der Javelin 200-Studie, einer Phase-II-Studie, weiterhin erprobt. In einem Update von 2018 zeigte sich nach einem Beobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten eine Ansprechrate von 33% und das progressionsfreie Überleben nach einem Jahr betrug 30%. Jedoch sprechen im Gegenzug immer noch 66% der Patientin auf die Therapie nicht an. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für die Entwicklung einer breiteren Therapieoption für diese Patienten.

Peritumorale Stromazellen

Die Zellen des MCC sind immunogen. Das bedeutet, dass die Tumorantigene in ihrer Umgebung eine Immunreaktion des Wirtsorganismus hervorrufen. In Haut und Schleimhäuten residierende DZ scannen mit ihren langen Zellausläufern ihre Umgebung ab. Erkennen sie ein Tumorantigen, können sie dieses aufnehmen, prozessieren und zum nächstgelegenen Lymphknoten migrieren. Dort aktivieren sie T-Zellen, indem sie ihnen das Antigen präsentieren. Die aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen proliferieren und infiltrieren das Gebiet, in dem das Antigen von der DZ aufgenommen wurde. Dort leiten sie eine spezifische Immunreaktion gegen jene Zellen ein, die auf ihrer Oberfläche dieselbe ursprüngliche Antigenstruktur tragen [43]–[47]. Auf diese Weise und durch die Beteiligung weiterer Immunzellen entsteht in der Tumorperipherie ein Stroma, welches aus TIL, tumorassoziierten Makrophagen, DZ und Suppressorzellen myeloider Abstammung besteht. Letztere Gruppe setzt sich zusammen aus unreifen Vorläuferzellen von Granulozyten, Makrophagen und DZ [15], [16], [48]. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass diese Prozesse Malignität nicht nur eliminieren, sondern im Gegenteil auch fördern können. Chronische Entzündung von Geweben führt bei manchen Karzinomen erst zur malignen Entartung, beispielsweise beim Barrett-Karzinom des Ösophagus. Bei anderen Karzinomen schafft die durch eine Vielzahl an chemischen Botenstoffen hervorgerufene Entzündung im Umfeld einer entarteten Zelle ein Milieu, das Tumorprogression durch Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierung fördert [49], [50].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Marker PD-1, PD-L1, NGF, TrkA und p75 sowohl auf den MCC Tumorzellen als auch auf den Zellen des Tumorstromas untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Marker neben den Tumorzellen auch

durch die peritumoralen Stromazellen exprimiert werden. Welche Funktion die Expression der Marker auf den verschiedenen Zellen haben könnte, soll in den folgenden Kapiteln erörtert werden.

IV.1 Expression von PD-1 und PD-L1

Wie mittlerweile in vielen Studien gezeigt werden konnte, wird unter anderem der PD-1/PD-L1 Signalweg von den Tumorzellen genutzt. Durch die Expression von PD-L1, werden Immunzellen des Tumorstromas, welche den passenden Rezeptor PD-1 exprimieren, in ihrer tumoreliminierenden Funktion gehemmt. Dies geschieht durch die Aktivierung der Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 (SHP2). Weitere Effektormoleküle, welche für die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors nötig sind, werden durch SHP2 gehemmt [51], [52]. Tumorstromawachstum und Metastasierung werden so erleichtert.

Expression von PD-1 auf Lymphozyten und Tumorzellen

PD-1 wird in der Regel vor allem von aktivierten Lymphozyten exprimiert [53]. Unser Ergebnis einer PD-1 Expression auf 66% der Lymphozyten passt sehr gut zu den Beobachtungen von Afanasiev et al. [54], die PD-1 Expression auf TILs beim MCC in 71% der Fälle nachwiesen. Bei im Blut zirkulierenden MCC-spezifischen T-Lymphozyten konnte die Gruppe eine Markerexpression auf 96% der Zellen nachweisen. PD-1 wurde in unserer Untersuchung vor allem auf den Lymphozyten exprimiert, die sich in direkter Nähe zu den Tumorzellen befanden. White et al. [55] konnten bei Patienten mit MM ähnliche Beobachtungen machen. TIL wiesen eine viel höhere PD-1 Expression auf, als T-Zellen in normalem Gewebe. Dass Tumorzellen die PD-1 Expression auf TIL induzieren können, zeigten Liu et al. [56] an Zellkulturen von Mamma- und Kolonkarzinomen. Möglicherweise wird auch beim MCC die Expression von PD-1 auf Lymphozyten durch die Tumorzellen induziert.

Außerdem wurde in unserer Untersuchung PD-1 in 2 von 35 Fällen (6%) auch auf Tumorzellen exprimiert. Dies ist überraschend, da sich nach derzeitigem wissenschaftlichem Kenntnisstand nicht klar erschließt, welchen evolutionären Vorteil die Tumorzellen durch diese Rezeptorexpression besitzen. Auch gibt es hierzu beim MCC bisher kaum weitere Ergebnisse. Mitteldorf et al. [15] wiesen ebenfalls die Expression von PD-1 auf Tumorzellen in 2/14 MCC Biopsien nach. Eine Schlussfolgerung zog die Arbeitsgruppe aus dieser Beobachtung nicht. Durch andere Studiengruppen konnte eine PD-1 Expression auf Tumorzellen des MM, des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms

(NSCLC) nachgewiesen werden [57], [58]. Beim HCC und MM löste die Bindung von PD-L1 Tumorwachstum aus. Durch die Gabe eines PD-L1 Antikörpers konnte in vitro und in vivo das Zellwachstum inhibiert werden [59]. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass PD-1 exprimierende Tumorzellen des NSCLC in vivo auf die Therapie mit einem PD-1 Inhibitor mit rascher Tumorprogredienz reagierten [60]. Insgesamt lassen sich also keine schnellen Rückschlüsse auf die Bedeutung und Funktion von PD-1 auf den Tumorzellen des MCC ziehen.

Expression von PD-L1 durch Tumorzellen

Bezug nehmend auf andere Publikationen [15], [61] wurde für PD-L1 auf Tumorzellen ein Schwellenwert von 1% angelegt, ab dem die Expression des Markers als positiv galt. PD-L1 wurde in unserem Kollektiv in 46% der Fälle durch Tumorzellen exprimiert. Afanasiev et al. [54] konnten den Marker in 69% der Fälle nachweisen. Untersuchungen von Lipson et al. [22] ergaben eine Expression von 49%. Hier wurde eine Probe als positiv gewertet, wenn mindestens 5% der Zellen den Marker exprimierten. Insgesamt sprechen die Hinweise dafür, dass Tumorzellen des MCC dazu neigen PD-L1 zu exprimieren und zwar als zielgerichteten Mechanismus, um über die PD-1 Aktivierung auf Lymphozyten die Immunabwehr zu schwächen.

Expression von PD-L1 durch CD68+ Spindelzellen

Mehreren Studien wiesen bereits nach, dass PD-L1 auch von peritumoralen Stromazellen exprimiert wird. Lipson et al. [22] konnten eine PD-L1 Expression auf peritumoralen Stromazellen beim MCC nachweisen, jedoch wurden diese Zellen nicht näher durch weitere Färbungen charakterisiert. Die Studiengruppe um Mitteldorf et al. [15] hingegen untersuchte die Expression von PD-L1 durch tumorumgebende Stromazellen beim MCC näher. Hierfür färbten sie die Proben mit einem CD33-Antikörper, welcher auf Suppressorzellen myeloider Abstammung exprimiert wird. Diese sind Vorläuferzellen der myeloiden Zellreihe, also von Granulozyten, Makrophagen und DZ [15]. Es zeigte sich, dass ein großer Teil der PD-L1 exprimierenden tumorumgebenden Stromazellen (45%) jener Zellgruppe zugehörig waren.

In den von uns untersuchten Biopsien konnten im peritumoralen Stroma spindelförmige CD68+ Zellen nachgewiesen werden. Makrophagen sind klassischerweise positiv für CD68, aber diese sind nicht spindelförmig. Ebenso wird CD68 von DZ exprimiert, da auch diese monozytischen Ursprungs sind [44], [62]. Aufgrund der Lokalisation, aus der unsere Biopsien stammen, handelte es sich wahrscheinlich um DZ, welche

typischerweise in Haut und Schleimhäuten vorzufinden sind. In unserem Kollektiv exprimierten die CD68+ Spindelzellen in 95% der Fälle (35/37) PD-L1. Auffällig war, dass die Spindelzellen direkt um die Tumorzellen lokalisiert waren und die CD68+ Spindelzellen dort PD-L1 exprimierten, wo sie an Tumorzellen grenzten.

IV.2 Expression von NGF, TrkA und p75

Die grundlegenden Funktionszusammenhänge zwischen NGF und seinen Rezeptoren wurden bereits in der Einleitung erläutert. Bindet NGF an TrkA, werden vor allem Signalkaskaden aktiviert, welche zum Überleben und zur Proliferation der Zelle führen. Dies geschieht über die Aktivierung der Effektormoleküle G-protein-Ras (Ras), Phospholipase Cy1 (PLCy1) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Hingegen führt die Bindung von NGF an p75 häufig zur Induktion der Apoptose [63]. Jedoch beschreiben Molloy et al. [41] bei Mammakarzinom eine ambivalente Rolle von p75. Durch die Aktivierung von Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) wurde hier über p75 ein Überlebenssignal ausgelöst.

Expression von NGF, TrkA und p75 auf Tumorzellen des MCC

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von NGF, TrkA oder p75 beim MCC untersucht und nachgewiesen.

Eine NGF-Expression durch Tumorzellen konnte in 23,5% der Fälle nachgewiesen werden. Vorangegangene Studien berichteten ebenfalls über die Expression von NGF durch solide Tumoren. Beim Mammakarzinom zeigte sich, dass eine autokrine TrkA-Aktivierung durch NGF exprimierende Tumorzellen zu Wachstum und Metastasierung des Mammakarzinoms führt. Beim Mammakarzinom stellte sich die Expression von NGF als prognostischer Marker für ein kürzeres Gesamtüberleben heraus [64]. Beim cholangiozellulären Karzinom korrelierte die Expression von NGF mit mehreren Progressionsparametern, wie zum Beispiel der Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der Metastasierungsrate und der Infiltration umgebender Gewebe [26].

Ferner wurde in unserer Studie TrkA in 100% und p75 in 19% der Fälle auf den Tumorzellen exprimiert. Die Signalwirkung von NGF hängt maßgeblich von TrkA ab. An Mäusen, die mit Mammakarzinomzellen beimpft wurden, konnte gezeigt werden, dass der pro-invasive und angiogenetische Effekt von NGF nur in gleichzeitiger Anwesenheit von TrkA und nicht über p75 allein ausgelöst wurde [65]. Die Annahme liegt nahe, dass die p75 Expression für das Tumorwachstum keine Relevanz hat, da die Aktivierung des Rezeptors zudem, wie bereits beschrieben, eher eine pro-apoptotische Signalfunktion

zu haben scheint. Jedoch zeigten die Ergebnisse einer Studie von Wehrman et al. [28], dass p75 die Bindungsaffinität von TrkA für NGF erheblich erhöht. In Neuronen von Mäusen, deren Gen für p75 ausgeschaltet wurde und in denen nur TrkA exprimiert wurde, waren viel höhere NGF Konzentrationen nötig, um die normale Zellfunktion aufrecht zu erhalten. Wohingegen Neurone, die neben TrkA auch p75 exprimierten, eine vielfach höhere Bindungsaffinität für NGF aufwiesen. Zhu et al. [36] untersuchten verschiedene Zellkulturen des Pankreaskarzinoms. Interessanterweise konnte sowohl eine stimulierende als auch eine inhibierende Wirkung von NGF auf die Tumorzellen nachgewiesen werden, je nachdem, in welchem Verhältnis TrkA und p75 exprimiert wurden. Hohe TrkA- und niedrige p75-Spiegel führten zu einer wachstumsstimulierenden Wirkung durch NGF. Bestand genau die umgekehrte Konstellation, resultierte eine inhibierende Wirkung. Die Expression beider Rezeptoren (TrkA > p75), könnte auch beim MCC eine verstärkende Wirkung für Tumorzellüberleben und -progression haben.

Ferner wurde eine übermäßige Aktivität von TrkA bei einigen malignen Erkrankungen als Onkogen identifiziert, darunter das kolorektale, das Ovarial- und das Schilddrüsenkarzinom sowie das maligne Melanom und die akute myeloische Leukämie. Diese übermäßige Aktivität resultiert aus Genfusionsmutationen, die zu einer permanenten Aktivierung der Kinase führen. Auch andere Tyrosinrezeptorkinasen sind bekannte Onkogene, z.B. EGFR und BCR-ABL [26], [66]. Beim Mammakarzinom konnten Lagadec et al. nachweisen, dass Angiogenese und Metastasierung der Zellen und damit die Invasivität in vitro durch die Überexpression von TrkA deutlich erhöht war [40].

Ob auch beim MCC, das in der Regel eine rasche Metastasierungstendenz aufweist, eine konstitutive Aktivierung von TrkA vorliegt, muss beispielsweise durch Testungen an Zellkulturen des MCC geprüft werden.

Expression von NGF und TrkA durch CD68+ Spindelzellen

NGF wird außerdem - in noch höherem Maße als durch die Tumorzellen - durch die tumorumgebenden CD68+ Spindelzellen exprimiert (23,5% versus 71%). Wie bei PD-L1 ist diese NGF-Expression vor allem an der Tumor-Stroma-Grenze stark ausgeprägt. Zudem exprimierten die CD68+ Spindelzellen in 92% der Fälle TrkA.

Es ist bekannt, dass der NGF-Signalweg auch bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass NGF auf Monozyten, Makrophagen und DZ des Menschen exprimiert wird. Diese Expression kann LPS-vermittelt erhöht werden, was zu massiver Produktion und Ausschüttung von entzündungsassoziierten Oberflächenrezeptoren und Chemokinen führt [67]–[70]. Des Weiteren beschrieben

Garaci et al. [71] bei in vitro mit HIV-1-beimpften Monozyten und Makrophagen des Menschen eine autokrine NGF-Stimulation, die zu einer hohen TrkA-Expression und somit zum Überleben der Zellen führte.

Dass die durch uns nachgewiesenen CD68+ Spindelzellen NGF und TrkA exprimieren, könnte also zu einem erhöhten Entzündungsgeschehen im Gewebe führen und ein tumorförderndes Milieu schaffen. Zudem kann die Expression von NGF und TrkA im Wechselspiel mit den Tumorzellen zur gegenseitigen Überlebens- und Proliferationsstimulation führen.

IV.3 Koexpression von PD-L1 und NGF auf CD68+ Spindelzellen

Die CD68+ Spindelzellen umgeben die Tumorzellen wie ein Zellwall und exprimieren zwei tumorfördernde Marker. Eine Koexpression von PD-L1 und NGF (95% und 71%) durch diese Zellen konnte nachgewiesen werden. Nun werden erstens die T-Zellen durch PD-L1 in ihrer tumoreliminierenden Funktion gehemmt. Zum Zweiten kann NGF an seinen Rezeptor TrkA, der in allen Biopsien auf den Tumorzellen vorzufinden war, binden und in der Tumorzelle ein Überlebenssignal auslösen. Es handelt sich also bei den CD68+ Spindelzellen um Zellen, die anscheinend in doppelter Hinsicht zum Überleben der Tumorzellen beitragen.

Wie bereits postuliert, ist es aufgrund der Expression von CD68 und der Zellmorphologie wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Zellen um DZ handelt. DZ sind eine heterogene Zellgruppe im peritumoralen Stroma. In den letzten Jahren rückten sie immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. In vielen soliden Tumoren, z.B. dem Mammakarzinom, dem malignen Melanom und Karzinomen des Gastrointestinal- oder des Urogenitaltrakts, wurden DZ im peritumoralen Stroma nachgewiesen [72]. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass diese Zellen die Tumorentwicklung beeinflussen [47], [73]. Deshalb besteht ein wachsendes Interesse in der Erforschung einer Antitumorthérapie, welche die Funktion der DZ beeinflusst.

DZ sind ein wichtiger Teil des Immunsystems und können sowohl eine immuninduzierende als auch eine immuninhibierende Funktion haben. Sie unterscheiden sich in Ursprung, Phänotyp und Lokalisation. Es gibt drei Hauptgruppen von DZ, davon zwei myeloiden und eine plasmazytischen Ursprungs. Ferner exprimiert jede Untergruppe von DZ eine Kombination an Oberflächenrezeptoren, die mitunter auch die Funktion der Zelle bestimmen. DZ zirkulieren im Blut, befinden sich in lymphogenem Gewebe und sind als Langerhans-Zellen in Haut und Schleimhäuten zu finden. Sie können sich in unterschiedlichen Reifestadien befinden, im Verlauf maturieren und sich dabei in ihrer Zellfunktion verändern.

Die Rolle von DZ in der Pathogenese maligner Tumoren ist komplex und noch nicht vollends verstanden. Die Quantität der peritumoralen Infiltration dieser Zellen wies in der Vergangenheit nicht klar auf einen Überlebensvorteil oder -nachteil der erkrankten Personen hin; beide Korrelationen wurden beobachtet [73]–[75]. Mehrere Studiengruppen wiesen eine Veränderung in Zahl, Reifegrad und Funktion von peritumoralen DZ im Laufe der Tumorprogression nach. Dies geschah durch den Einfluss von Zytokinen des umgebenden Milieus auf die DZ. Die Studienergebnisse deuten darauf hin, dass DZ im Verlauf der Tumorentwicklung von ihrer tumorinhibierenden zu einer -stimulierenden Aktivität übergehen. Krempski et al. [76] zeigten an Mäusen, welche mit Ovarialkarzinomzellen beimpft wurden, dass diese im Verlauf andere Zytokine produzierten. Die DZ in fortgeschrittenem Tumorstadium waren unreife Zellen und in ihrer antigenpräsentierenden Funktion geschädigt.

Ein spezifischer Mechanismus der DZ um die Tumorprogression zu fördern, ist die Expression von PD-L1. Mu et al., (2011) [77] untersuchten Biopsien vom NSCLC und konnten die Expression von PD-L1 auf DZ bei etwa 50% nachweisen. Dabei exprimierten unreife Zellen den Marker fast doppelt so häufig wie reife Zellen. Da die tumorfördernden Eigenschaften von DZ mit einem geringen Reifestadium assoziiert werden, kann es sich hier um einen Transitionszustand der DZ vom tumorsuppressiven in den tumorsupportiven Zustand gehandelt haben. In welchem Tumorstadium der Wechsel von karzinomeliminierenden zu karzinombegünstigenden DZ stattfindet und welche klinischen oder immunhistochemischen Indikatoren hierfür sinnvollerweise in der Praxis verwendet werden können, bleibt zu eruieren.

Weitere Studiengruppen fanden heraus, dass Tumorzellen durch die Sekretion von Signalmolekülen wie Interleukin-10 (IL-10) eine vermehrte Expression von „T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3“ (TIM-3) auf DZ auslösten [14], [74], [78]. TIM-3 ist ein potenter T-Zell-Inhibitor. Tumorzellen können ferner die Menge der DZ verringern. In vitro konnten Kiertscher et al. [79] darstellen, wie Tumorzellen verschiedenen Ursprungs, darunter NSCLC, Adenokarzinom der Lunge, Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom und MM die Apoptose von DZ induzierten.

Tumorzellen können DZ also vermutlich funktionsunfähig machen, sie der Apoptose zuführen oder sie durch ein Gemisch aus Signalmolekülen so modulieren, sodass sie auf andere Immunzellen inhibierend wirken. DZ können dann im weiteren Verlauf das Tumorstadium fördern und werden so zu Werkzeugen der Tumorzellen. Vorstellbar ist, dass es sich bei den durch uns nachgewiesenen CD68+ Spindelzellen um undifferenzierte DZ handelt, die von ihrer tumorinhibierenden zu einer tumorstimulierenden Funktion gewechselt haben.

Differenzierte Untersuchungen dieser Zellgruppe bezüglich Differenzierungsstadium, Funktion und Wirkbeziehung zu Tumorzellen des MCC müssen folgen, um diese These zu überprüfen. Insbesondere der Mechanismus – potentiell durch Tumorzellen induziert – der zur Expression von NGF und PD-L1 führt oder der die Migration dieser Zellen bedingt, scheint maßgebend für das Verständnis über die Wirkbeziehung der Zellen zueinander zu sein.

IV.4 Überleben

In unserem Kollektiv war die Expression von PD-1 auf Lymphozyten mit einem schlechteren Outcome assoziiert, was zur Wirkungsweise des Signalwegs passt. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

In der Studie von Lipson et al. [22] war die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden. Dies steht im Widerspruch zu unserem Ergebnis, nach dem die Expression mit einem schlechteren Überleben verbunden war (statistisch nicht signifikant). Gleiche Beobachtungen machten Wu et al. [80], die die Ergebnisse zahlreicher Studien zur PD-L1-Expression und dem Überleben solider Tumoren zusammentrugen. Die Arbeitsgruppe analysierte 28 Publikationen, welche die PD-L1 Expression auf Zellen solider Tumoren und das Gesamtüberleben untersuchten. Darunter waren Karzinome des Urogenitaltrakts, der Lunge, des Gastrointestinaltrakts, der Haut und des zentralen Nervensystems. In allen Studien war die PD-L1 Expression mittels immunhistochemischer Färbung detektiert worden. Es zeigte sich insgesamt ein signifikant schlechteres Überleben bei Patienten mit soliden Tumoren, die PD-L1 exprimierten. Jedoch wurden in den 28 Studien teilweise unterschiedliche Toleranzgrenzen (Cut-Off) gesetzt. Manche Studien werteten die Biopsien als PD-L1 positiv, wenn der Marker exprimiert wurde, ohne eine spezifische Mindestexpression zu nennen. Bei anderen lag die minimale Expressionsrate auf Tumorzellen zwischen 5 und 12,2%. Wieder andere nutzten verschiedene Scores zur Evaluation der Positivität für den Marker. Je nach Färbemethode kann es zu unterschiedlichen Färbeintensitäten kommen, weshalb oft individuelle Cut-Offs gesetzt wurden. Diese verschiedenen Cut-Offs wurden durch die Arbeitsgruppe von *Wu et al.* in den statistischen Berechnungen berücksichtigt. In unserer Untersuchung wurden Biopsien als PD-L1 positiv gewertet, wenn 1% der Tumorzellen den Marker exprimierten. Trotz des unterschiedlichen Cut-Offs reiht sich auch unsere Beobachtung in die zitierten Ergebnisse ein. Sowohl unsere Ergebnisse als auch die von *Wu et al.*, weisen auf ein schlechteres Gesamtüberleben bei PD-L1 Expression durch solide Tumoren hin. Dies ergibt Sinn vor dem Hintergrund, dass die PD-1 Aktivierung auf T-Zellen zu einer verminderten Zellaktivität und deshalb zu einer geringeren Tumorelimination führt.

Die Expression von NGF durch die tumorumgebenden CD68+ Spindelzellen in der vorliegenden Studie war ebenfalls mit einem schlechteren Outcome assoziiert, allerdings ohne statistische Signifikanz. Jedoch stützt diese Beobachtung unsere These, dass die Zellen eine tumorbegünstigende Rolle einnehmen.

In der statistischen Analyse zeigte sich ein schlechteres Überleben, wenn 1) PD-L1 auf Tumorzellen, 2) PD-1 auf Lymphozyten und 3) NGF auf CD68+ Spindelzellen exprimiert wurde. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant (alle p-Werte >0,05), da die Kohorte eine zu geringe Größe hatte (n=39). Die Ergebnisse zeigen jedoch die Tendenz, dass die Expression der Marker auf den jeweiligen Zellentitäten mit einem schlechteren Outcome verbunden sein könnte. Die Ergebnisse sind mit dem Wissen über die Funktionsweise der untersuchten Marker und Ergebnissen anderer Studien vereinbar.

IV.5 Mögliche neue Therapieansätze

Aufgrund der guten Ergebnisse in wissenschaftlichen Studien, wurde 2014 der erste PD-1-Inhibitor in der Behandlung des MM in den USA zugelassen und die Immuntherapie mit PD-1/PD-L1 Inhibitoren wird mittlerweile bei fast allen Karzinomtypen untersucht. Laufende klinische Studien haben zum Ziel, die Wirksamkeit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie mit PD-1- und PD-L1-Inhibitoren beim MCC zu testen. Der Einsatz von Avelumab als adjuvante Therapie der ersten Wahl bei Patienten mit metastasiertem MCC wird derzeit getestet und erste vielversprechende Daten wurden publiziert [81]. 62,1% der Patienten sprachen auf das Medikament an. Bei 83% dieser Patienten betrug die Ansprechdauer mindestens 3 Monate. In einer Phase-I/II-Studie wird durch Topalian et al. [82] momentan außerdem Nivolumab (ein PD-1-Inhibitor) als neoadjuvantes Therapeutikum bei Patienten mit MCC ohne Fernmetastasen untersucht. Eine massive Tumorreduktion nach der Therapie mit dem Arzneimittel konnte radiologisch und histologisch nachgewiesen werden und die meisten Patienten waren ein Jahr nach der Operation tumorfrei. Diese Ergebnisse sind vielversprechend und es ist wünschenswert, dass weiterhin erfolversprechende therapeutische Ansätze formuliert und getestet werden.

Aufgrund der durch uns gesammelten Ergebnisse lässt sich vermuten, dass Tumorzellen im Zusammenspiel mit den umgebenden CD68+ Spindelzellen, die ebenfalls PD-L1 exprimierten, eine potente Stimulation des hemmenden PD-1/PD-L1 Signalwegs in T-Lymphozyten auslösen. Dafür spricht auch, dass manche Patienten, deren MCC Tumorzellen keine oder wenig PD-L1-Expression aufwiesen, in der Vergangenheit dennoch auf die Therapie mit einem PD-L1 Inhibitor ansprachen [15].

Ferner konnte in unserer Studie eine ausgeprägte Expression von TrkA auf Tumorzellen nachgewiesen werden. In einem konstitutiv aktivierten Zustand könnte es als Onkogen

dienen. Es gibt mehrere Beispiele von Tyrosinkinase, welche in konstitutiv aktiviertem Zustand die Tumorgenese vorantreiben. [26], [66]. Beim NSCLC beispielsweise ist EGFR häufig überaktiv. Die Therapie mit Erlotinib, einem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor, zeigt bei diesem Tumor im Vergleich einen deutlichen Vorteil zur konventionellen Chemotherapie [26], [66]. Ein bekanntes Kinase-Fusionsgen ist BCR-ABL bei der chronischen myeloischen Leukämie. Imatinib, welches die Kinase inhibiert, hat zu einer drastischen Therapieverbesserung geführt [83]. Es bleibt herauszufinden, ob eine TrkA-Überaktivität durch ein Genfusionsprotein der Tumorentstehung des MCC zugrunde liegt. Die gezielte Inhibition der TrkA/NGF-Interaktion könnte aber - auch vor dem Hintergrund, dass die CD68+ Spindelzellen NGF exprimieren - einen möglichen neuen Ansatzpunkt für eine Antitumorthherapie beim MCC darstellen. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Inhibitoren von Tyrosinrezeptorkinasen (Trk) verschiedener Tumorentitäten entwickelt und teilweise klinisch getestet [39]. Manche davon zeigten erfolgversprechende Resultate. Tatematsu et al. [42] zeigten, dass AZD7451, ein spezifischer Inhibitor von Trk, in vitro das Wachstum von Kolonkarzinomzellen, welche eine TrkA-Überaktivität durch TrkA Fusionsmutation aufwiesen, inhibierte [42]. Es wurden bereits erste klinische Studien mit Trk-Inhibitoren durchgeführt und der Multikinaseinhibitor Entrectinib darf heute in der Therapie von TrkA-positiven NSCLC und Kolorektalkarzinomen verwendet werden [39]. Überdies wurden in einer Phase-II-Studie Kinder und Erwachsene, die an einem Karzinom mit Trk-Überaktivität erkrankt waren, mit Larotrectinib, einem spezifischen Trk-Inhibitor, behandelt. Diese zeigten eine globale Ansprechrate von 75% und ein progressionsfreies Überleben von 55% nach einem Jahr [84]. Es konnte jedoch in der Vergangenheit eine schnelle Resistenzentwicklung bei den mit einem TrkA-Inhibitor behandelten Patienten beobachtet werden [37]. Aktuell werden deshalb weitere Trk-Inhibitoren getestet, die auch eine Wirksamkeit gegen bisher resistente Kinasen aufweisen und zudem weitere Trk-Effektormoleküle wie MAPK hemmen [85], [86]. Eine duale Therapie zur Inhibition von PD-L1 und TrkA/NGF könnte beim MCC zu einer potenteren Wirkung führen. Die Hemmung der NGF/TrkA-Interaktion könnte auch für jene Patienten eine Therapiemöglichkeit darstellen, die auf keine der bisher zugelassenen Therapien ansprechen.

Wie bereits erläutert, gibt es Hinweise, dass DZ im Verlauf der Tumorentwicklung von einer tumorinhibierenden in eine tumorfördernde Funktion übergehen. Ein Therapieansatz, der an der tumorinhibierenden Fähigkeit von DZ ansetzt, ist die Impfung mit DZ. Hierzu werden patienteneigene DZ in vitro mit Tumorantigenen beladen und dem Patienten dann wieder verabreicht. Im Blut des Patienten aktivieren die DZ mit diesen Antigenen T-Zellen in großer Zahl, welche daraufhin die Tumorzellen erkennen und

eliminieren. Bisher konnte in kleineren klinischen Studien nachgewiesen werden, dass die gut verträgliche Therapie zu einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten führte [87]. Beispielsweise wird derzeit in einer Phase I/II Studie die Kombination von Avelumab mit DZ-Impfung bei vorbehandelten Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom untersucht (clinicaltrials.gov). Aufgrund der vermutlich hohen Beteiligung von DZ im Tumorgeschehen beim MCC kann eine auf dendritische Zellen bezogene Therapie ein weiterer Baustein in der MCC-Therapie darstellen.

Insgesamt zeigt unsere Untersuchung, dass eine kombinierte Inhibition der PD-1 Achse mit Inhibition der TrkA-Achse zu einer potenteren Tumorabwehr beim MCC führen könnte, als die Inhibition von PD-L1 allein. Die Beobachtungen zu den CD68+ Spindelzellen sprechen dafür, den Einfluss dieser Zellen zu hemmen. Dies kann über eine direkte Modulation der Zellfunktion geschehen oder aber die initiale Migration der Zellen zur Tumorkomplexion könnte unterbunden werden. Zielgenaue Angriffstellen können erst endgültig formuliert werden, sobald ein detaillierteres Wissen über diese Zellentität vorhanden ist.

IV.6 Fazit

Die Expressionsmuster von PD-1 und PD-L1 auf den Tumorzellen und den Lymphozyten beim MCC ist mit anderen Studien vergleichbar. Dass die Expression von PD-1 auf Lymphozyten und PD-L1 auf Tumorzellen mit einem schlechteren Überleben verbunden war, steht in Übereinstimmung mit der Wirkungsweise des Signalwegs. Möglicherweise induzieren Tumorzellen die Expression von PD-1 auf Lymphozyten, um dann selbst den Liganden PD-L1 zu exprimieren. Welchen Vorteil aber die PD-1-Expression auf den Tumorzellen bringt, ist unklar. Möglicherweise wird über den Rezeptor Zellwachstum induziert, da es hierfür bei anderen Tumorentitäten wie z.B. dem MM Hinweise gibt.

Auch die Aktivierung des NGF/TrkA/p75 Signalweg scheint beim MCC eine entscheidende tumorfördernde Rolle einnehmen. Die Marker werden auf Tumorzellen und Zellen des peritumoralen Stromas exprimiert. In allen Biopsien wurde TrkA auf Tumorzellen exprimiert, in vielen Fällen auch der Ligand NGF. Vor allem aber wurde NGF auch von spindelförmigen Zellen exprimiert, die positiv für CD68 waren. Hier findet sich eine Schnittstelle mit der Expression von TrkA auf den Tumorzellen. Es liegt nahe, dass die autokrine- und parakrine Bindung von NGF an seinen Rezeptor TrkA in der Tumorzelle ein Überlebenssignal auslöst, was zu Tumorwachstum und -progression führt. Dies könnte auch der Grund sein, warum manche Patienten von der Therapie mit einem PD-L1 Inhibitor nicht profitieren, da der durch NGF ausgelöste Überlebensmodus der Tumorzellen dann mit der Elimination durch Lymphozyten konkurriert. Passend dazu

ging die Expression von NGF auf CD68+ Spindelzellen mit einem schlechteren Überleben einher. Nachteilig kommt hinzu, dass die CD68+ Spindelzellen zusätzliche zu NGF auch eine Koexpression von PD-L1 aufwiesen. Neben der tumorfördernden Komponente durch die NGF Expression, hemmt PD-L1 in bereits beschriebener Weise die Antitumorantwort des Immunsystems. Die CD68+ Spindelzellen scheinen also potente, tumorfördernde Akteure des peritumoralen Stromas zu sein. Der Nachweis von CD68 auf solchen spindelförmigen Zellen im peritumoralen Stroma des MCC wurde durch unsere Untersuchung ebenfalls erstmalig erbracht und ein möglicher Wirkmechanismus erstmalig formuliert. Möglicherweise stimulieren oder locken die Tumorzellen diese Zellentität durch chemische Botenstoffe an, um von deren tumorfördernden Eigenschaften zu profitieren. Über TrkA, der auch auf den CD68+ Spindelzellen exprimiert wird, könnte ebenfalls in einer auto- und parakrinen Weise das Überleben und die Proliferation dieser Zellen unterstützt werden. Des Weiteren geht die Expression von p75 auf Tumorzellen und CD68+ Spindelzellen womöglich mit einer verbesserten Bindungsaffinität von NGF an TrkA einher.

Auffällig war, dass die Expression der getesteten Marker vor allem dort ausgeprägt war, wo Tumor und peritumorales Stroma aufeinandertrafen. Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen waren in direkter Proximität zu den Tumorzellen vorzufinden. An der Tumor-Stroma-Grenze bildeten die CD68+ Spindelzellen also eine Art Schutzwall hoher biochemischer Aktivität, der den Tumorzellen die Immunevasion ermöglicht.

Bei den CD68+ Spindelzellen handelt es sich aufgrund der Lokalisation und Morphologie wahrscheinlich um DZ. Die Rolle von DZ in der Tumorentstehung und -progression ist komplex. Einige Studienergebnisse weisen auf klare tumorfördernde Eigenschaften dieser Zellen im Verlauf der Tumorentwicklung hin. Unsere Untersuchungen weisen ebenfalls auf eine tumorbegünstigende Rolle der CD68+ Spindelzellen beim MCC hin. Möglicherweise handelt es sich hier um undifferenzierte DZ, die von einer tumorinhibierenden zu einer tumorfördernden Funktion gewechselt haben.

Aufgrund der hohen Expression von TrkA auf Tumorzellen und NGF durch die CD68+ Spindelzellen, kann die Hemmung des NGF/TrkA/p75 Signalwegs insgesamt eine ernstzunehmende Therapiemöglichkeit beim MCC darstellen. Zusätzlich zur Hemmung des PD-1/PD-L1 Signalwegs kann eine breitere Antitumorthérapie möglich werden.

Zu bedenken ist, dass die hier postulierten Thesen und Schlussfolgerungen auf morphologischen Gesichtspunkten basieren. Zu deren Verifizierung sind funktionelle Untersuchungen nötig und erstrebenswert.

Die Fallzahl von 39 in dieser Arbeit, ist mit anderen Studien vergleichbar, da aufgrund der Seltenheit des Karzinoms lokale Studien in der Regel nur mit kleiner Fallzahl

durchgeführt werden können. Dadurch aber sind die Ergebnisse, wie auch in der vorliegenden Arbeit, häufig statistisch nicht signifikant. Es ist also notwendig, weiterhin möglichst viele Patienten mit dieser Erkrankung in Studien einzuschließen. Um besser vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, ist es ebenso sinnvoll, möglichst ähnliche Färbeverfahren und Toleranzgrenzen (Cutoffs) zu verwenden.

Für die Zukunft wäre erstrebenswert, die Funktion der CD68+ Spindelzellen, weitergehend zu untersuchen. Zu klären wäre, über welchen Mechanismus die Zellen angelockt werden oder welche chemischen Botenstoffe der Tumorzellen die Expression der Oberflächenmarker induzieren. Könnte man diesen Mechanismus blockieren und somit die Potenz der CD68+ Spindelzellen verringern, so wäre möglicherweise mit einer verbesserten Ansprechrate von PD-1/PD-L1 Inhibitoren zu rechnen. Da es sich bei CD68 nicht um einen spezifischen Marker für DZ handelt, wäre es für zukünftige Studien interessant zu bestätigen, ob es sich tatsächlich um DZ handelt. Die Mechanismen, die in der Funktion und Regulation dieser Zellen zum Tragen kommen, sollten weitergehen erforscht werden.

V. Zusammenfassung

Das MCC ist ein aggressiver Hauttumor mit steigender Inzidenz und schlechter Prognose. Die Therapie von Patienten mit metastasiertem Tumor stellt eine Herausforderung dar.

Tumorentstehung und -progression werden durch die Immunzellen des peritumoralen Stromas beeinflusst. Als sog. „Immun-Checkpoint-Blockade“ steht seit dem Jahr 2017 für Patienten mit metastasiertem MCC eine Therapie mit dem PD-L1 Inhibitor Avelumab zur Verfügung. Ein weiterer Mechanismus, welcher mit Tumorwachstum in Verbindung gebracht wird, ist die Überaktivität von TrkA, welches neben p75 ein Rezeptor des Wachstumshormons NGF ist. Eine TrkA-Überaktivität konnte unter anderem beim kolorektalen Karzinom, Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinom nachgewiesen werden. Beim MCC wurde die Expression der an diesem Signalweg beteiligten Marker bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der Expression von PD-1, PD-L1, NGF, TrkA und p75 auf Tumorzellen und Zellen der peritumoralen Stromas in Biopsien des MCC. Rückschlüsse über die Interaktion von Tumorzellen mit den Zellen des peritumoralen Stromas sollten mögliche neue Zielmoleküle für die Therapie des MCC aufweisen. Von 55 Patienten, die im Institut für Dermatologie des Uniklinikums Kiel behandelt worden waren, eigneten sich 39 MCC Biopsien für die weitere histologische Aufarbeitung. Retrospektiv wurden alle krankheitsbezogenen Daten der 39 Patienten zusammengetragen. Nach der immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte mit den jeweiligen Markern, folgte die Auswertung der Markerexpression.

PD-1 wurde erwartungsgemäß durch Lymphozyten exprimiert. Tumorzellen exprimierten PD-L1 und NGF (43% und 23,5%) sowie in 100% der Fälle TrkA. Im peritumoralen Stroma fanden sich Zellen, die eine Koexpression von NGF (71%) und PD-L1 (95%) aufwiesen. In 66% der Fälle exprimierten sie auch TrkA. Diese Zellen umgaben die Tumorzellen wie ein Wall und waren positiv für CD68, einem Marker, der typischerweise auf Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zu finden ist. Die Markerexpression war besonders ausgeprägt in Bereichen, in denen sich Tumorzellen und peritumorale Stromazellen sich in direkter Proximität zueinander befanden.

Die Markerexpression auf den verschiedenen Zellentitäten wurde durch statistische Testungen mit dem krankheitsspezifischen und dem Gesamtüberleben korreliert. Die PD-1 Expression auf Lymphozyten sowie die PD-L1 Expression durch Tumorzellen korrelierte mit einem schlechteren Überleben. Expression von NGF durch die CD68+ Spindelzellen korrelierte ebenfalls mit schlechterem Überleben. Aufgrund der kleinen Fallzahl war in der Überlebensanalyse keine statistische Signifikanz gegeben, jedoch weisen die Ergebnisse auf die Tendenz für ein schlechteres Überleben hin.

Die CD68+ Spindelzellen im peritumoralen Stroma des MCC wurden durch uns zum ersten Mal nachgewiesen. Es handelt sich vermutlich um dendritische Zellen, welche eine tumorbegünstigende Rolle einnehmen. Durch die Expression von PD-L1 fördern sie die T-Zell Hemmung und durch die Expression von NGF stimulieren sie über den Rezeptor TrkA das Überleben der Tumorzellen. Die CD68+ Spindelzellen waren direkt um die Tumorzellen lokalisiert. Möglicherweise beeinflussen die Tumorzellen die Funktion dieser Zellentität zu ihren Gunsten oder fördern deren Migration, sodass sie zur Verbesserung der eigenen Überlebenschancen wie ein Schutzwall fungieren. Die CD68+ Spindelzellen nehmen womöglich eine potente tumorbegünstigende Rolle beim MCC ein.

Die Inhibition des PD-1/PD-L1-Signalwegs etabliert sich in der Therapie des MCC als wertvolle Erweiterung des Behandlungsspektrums immer mehr. Dass manche Patienten jedoch nicht auf die Therapie mit Avelumab ansprechen, könnte darin begründet sein, dass die potentere T-Zell Antwort durch den TrkA vermittelten Überlebensmodus der Tumorzellen kompensiert wird. Neben der Hemmung des PD-1/PD-L1 Signalwegs ist für die Zukunft auch die Hemmung der NGF/TrkA Achse ein vielversprechender Therapieansatz. Ferner könnte durch die Hemmung der Rekrutierung tumorfördernder CD68+ Spindelzellen das Ansprechen auf eine Therapie PD-1/PD-L1 Inhibitoren verbessert werden.

Die Hypothesen beruhen auf morphologischen Erkenntnissen. Um sie zu validieren, müssen weitere funktionelle Untersuchungen z.B. mit Zellkulturen durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Agelli, L. X. Clegg, J. C. Becker, and D. E. Rollison, "The Etiology and Epidemiology of Merkel Cell Carcinoma," *Curr. Probl. Cancer*, vol. 34, no. 1, pp. 14–37, 2010.
- [2] C. Lebbe *et al.*, "Diagnosis and treatment of Merkel Cell Carcinoma. European consensus-based interdisciplinary guideline," *Eur. J. Cancer*, vol. 51, no. 16, pp. 2396–2403, 2015.
- [3] T. Amaral, U. Leiter, and C. Garbe, "Merkel cell carcinoma: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and therapy," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, pp. 1–16, 2017.
- [4] P. W. Harms, "Update on Merkel Cell Carcinoma," *Clin. Lab. Med.*, vol. 37, no. 3, pp. 485–501, 2017.
- [5] S. L. M. Mzk, J. C. Becker, T. Eigentler, B. Frerich, and T. Gambichler, "S2k-Guideline Merkel Cell Carcinoma (MCC , Neuroendocrine Carcinoma of the Skin) – Update 2018 Abstrakt," no. 032, pp. 1–28, 2018.
- [6] D. Schadendorf *et al.*, "Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs," *Eur. J. Cancer*, vol. 71, pp. 53–69, 2017.
- [7] L. H. Sobin, M. K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Editio. 2009.
- [8] D. Erstad and J. Cusack, "Mutational Analysis of Merkel Cell Carcinoma," *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 4, pp. 2116–2136, 2014.
- [9] M. P. Pulitzer, "Merkel Cell Carcinoma," *Surg. Pathol. Clin.*, pp. 1–10, 2017.
- [10] M. Sidiropoulos, W. Hanna, S. J. Raphael, and Z. Ghorab, "Expression of TdT in Merkel Cell Carcinoma and Small Cell Lung Carcinoma," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 135, no. 6, pp. 831–838, 2011.
- [11] J. C. Becker, C. Assaf, D. Vordermark, S. N. Reske, O. Seitz, and S. Grabbe, "S2k - Kurzleitlinie - Merkelzellkarzinom (MCC, kutanes neuroendokrines Karzinom) – Update 2012," no. 032, pp. 1–18, 2012.
- [12] S. Hennessy and P. Vereecken, "Management of Merkel tumours : an evidence-based review," *Curr. Opin. Oncol.*, 2008.
- [13] J. L. Schwartz *et al.*, "NCCN guidelines implementation in the multidisciplinary merkel cell carcinoma program at the University of Michigan," *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.*, vol. 12, no. 3, pp. 434–441, 2014.
- [14] Y. Ma, G. V. Shurin, D. W. Gutkin, and M. R. Shurin, "Tumor Associated Regulatory Dendritic Cells," vol. 22, no. 4, pp. 298–306, 2013.
- [15] C. Mitteldorf, A. Berisha, M. Tronnier, M. Pfaltz, and W. Kempf, "PD-1 and PD-L1 in neoplastic cells and the tumor microenvironment of Merkel cell carcinoma Running," *Pers. Psychol.*, pp. 1–29, 2013.
- [16] V. Umansky, A. Sevko, C. Gebhardt, and J. Utikal, "Myeloide Suppressorzellen (MDSC) beim malignen Melanom," *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology*, vol. 12, no. 11, pp. 1021–1027, 2014.
- [17] H. O. Alsaab *et al.*, "PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. AUG, pp. 1–15, 2017.
- [18] H. Dong *et al.*, "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 8, pp. 793–800, 2002.
- [19] G. J. Freeman *et al.*, "Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 7, pp. 1027–1034, 2000.
- [20] L. Chen, "Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 5, pp. 336–347, 2004.
- [21] A. Patnaik *et al.*, "Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 19, pp. 4286–4293, 2015.
- [22] E. J. Lipson *et al.*, "PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 54–63, 2013.

- [23] C. R. Heery *et al.*, "Avelumab for metastatic or locally advanced previously treated solid tumours (JAVELIN Solid Tumor): a phase 1a, multicohort, dose-escalation trial," *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 5, pp. 587–598, 2017.
- [24] N. M. Cassler, D. Merrill, C. K. Bichakjian, and I. Brownell, "Merkel Cell Carcinoma Therapeutic Update," *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 36, no. 5, pp. 1011–1014, 2016.
- [25] P. Terheyden, A. Mohr, and E. A. Langan, "Immuncheckpointinhibition beim Merkel-Zell-KarzinomImmune checkpoint inhibition in Merkel cell carcinoma," *Der Hautarzt*, vol. 70, no. 9, pp. 684–690, 2019.
- [26] I. E. Demir, E. Tieftrunk, S. Schorn, H. Friess, and G. O. Ceyhan, "Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1866, no. 1, pp. 37–50, 2016.
- [27] E. Prada *et al.*, "Tropomyosin receptor kinase: A novel target in screened neuroendocrine tumors," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 25, no. 5, pp. 547–560, 2018.
- [28] T. Wehrman, X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, and K. C. Garcia, "Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors," *Neuron*, vol. 53, no. 1, pp. 25–38, 2007.
- [29] G. Prencipe *et al.*, "Nerve Growth Factor Downregulates Inflammatory Response in Human Monocytes through TrkA," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 7, pp. 3345–3354, 2014.
- [30] P. W. Mantyh, M. Koltzenburg, L. M. Mendell, and D. L. Leslie, TiveShelton, "Antagonism of Nerve Growth Factor-TrkA Signaling and the Relief of Pain," *Anesthesiology*, vol. 115, no. 5, pp. 189–204, 2012.
- [31] R. A. Bradshaw, J. Pundavela, J. Biarc, R. J. Chalkley, A. L. Burlingame, and H. Hondermarck, "NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling," *Adv. Biol. Regul.*, vol. 58, pp. 16–27, 2015.
- [32] S. D. Skaper, "Nerve growth factor: A neurokine orchestrating neuroimmune-endocrine functions," *Mol. Neurobiol.*, vol. 24, no. 1–3, pp. 183–199, 2001.
- [33] C. Missale and P. F. Spano, "Nerve growth factor in pituitary development and pituitary tumors," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 19, no. 2, pp. 128–150, 1998.
- [34] H. Hondermarck, "Neurotrophins and their receptors in breast cancer," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 23, no. 6, pp. 357–365, 2012.
- [35] A. Vaishnavi *et al.*, "Oncogenic and drug sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 11, pp. 1469–1472, 2014.
- [36] Z. Zhu *et al.*, "Nerve Growth Factor Exerts Differential Effects on the Growth of Human Pancreatic Cancer Cells," *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. January, pp. 105–112, 2001.
- [37] L. Aubert *et al.*, "NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib," *Oncotarget*, vol. 6, no. 12, pp. 9807–9819, 2015.
- [38] P. B. Ehrhard, P. Erb, U. Graumann, and U. Otten, "Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 23, pp. 10984–10988, 1993.
- [39] A. Amatu, A. Sartore-Bianchi, and S. Siena, "NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types," *ESMO Open*, vol. 1, no. 2, p. e000023, 2016.
- [40] C. Lagadec *et al.*, "TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells," *Oncogene*, vol. 28, no. 18, pp. 1960–1970, 2009.
- [41] N. H. Molloy, D. E. Read, and A. M. Gorman, "Nerve growth factor in cancer cell death and survival," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 510–530, 2011.
- [42] T. Tatematsu *et al.*, "Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7451 in vitro," *Mol. Clin. Oncol.*, vol. 2, no. 5, pp. 725–730, 2014.
- [43] S. Dalia, H. Shao, E. Sagatys, H. Cualing, and L. Sokol, "Dendritic cell and histiocytic neoplasms: Biology, diagnosis, and treatment," *Cancer Control*, vol. 21, no. 4, pp. 290–300, 2014.
- [44] D. Ferenbach and J. Hughes, "Macrophages and dendritic cells: What is the difference?," *Kidney Int.*, vol. 74, no. 1, pp. 5–7, 2008.
- [45] M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha, "The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the

- Inflamed Setting," *Changes*, vol. 41, no. 9, pp. 15–25, 2013.
- [46] S.-R. Woo, L. Corrales, and T. F. Gajewski, "Innate Immune Recognition of Cancer," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 33, no. 1, pp. 445–474, 2015.
 - [47] G. M. Mantia-Smaldone and C. S. Chu, "A review of dendritic cell therapy for cancer: Progress and challenges," *BioDrugs*, vol. 27, no. 5, pp. 453–468, 2013.
 - [48] G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena, "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 86, no. 5, pp. 1065–1073, 2009.
 - [49] S. K. Biswas, P. Allavena, and A. Mantovani, "Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions," *Semin. Immunopathol.*, vol. 35, no. 5, pp. 585–600, 2013.
 - [50] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Birkwill, "Cancer-related inflammation," *Nature*, vol. 454, 2008.
 - [51] T. Okazaki, S. Chikuma, Y. Iwai, S. Fagarasan, and T. Honjo, "A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application," *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 12, pp. 1212–1218, 2013.
 - [52] X. Wang, F. Teng, L. Kong, and J. Yu, "PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 9, pp. 5023–5039, 2016.
 - [53] S. Muenst *et al.*, "Expert Opinion on Therapeutic Targets The PD-1 / PD-L1 pathway : biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy The PD-1 / PD-L1 pathway : biological background and clinical relevance of an emerging treatment," vol. 8222, 2015.
 - [54] O. K. Afanasiev *et al.*, "Merkel polyomavirus-specific T cells fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and tim-3 exhaustion markers," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 19, pp. 5351–5360, 2013.
 - [55] D. E. White *et al.*, "Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired," *Blood*, vol. 114, no. 8, pp. 1537–1544, 2009.
 - [56] Y. Liu *et al.*, "Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8 + T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation," *Cancer Cell*, vol. 33, no. 3, pp. 480–494.e7, 2018.
 - [57] H. Yao, H. Wang, C. Li, J. Y. Fang, and J. Xu, "Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. July, p. 1774, 2018.
 - [58] S. Kleffel *et al.*, "Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth," *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1242–1256, 2015.
 - [59] H. Li, X. Li, S. Liu, L. Guo, B. Zhang, and Q. Ye, "PD-1 Checkpoint Blockade in Combination with an mTOR Inhibitor Restrains Hepatocellular Carcinoma Growth Induced by Hepatoma Cell-Intrinsic PD-1," *Hepatology*, vol. 66, no. 6, pp. 1920–1933, 2017.
 - [60] S. Du *et al.*, "Blockade of Tumor-Expressed PD-1 promotes lung cancer growth," *Oncoimmunology*, vol. 7, no. 4, pp. 1–9, 2018.
 - [61] E. R. Parra *et al.*, "Image analysis-based assessment of PD-L1 and tumor-associated immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non-small cell lung carcinoma patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 6278–6289, 2016.
 - [62] W. Kempf *et al.*, "CD68+ cells of monocyte/macrophage lineage in the environment of AIDS-associated and classic-sporadic Kaposi sarcoma are singly or doubly infected with human herpesviruses 7 and 6B.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 14, pp. 7600–5, 1997.
 - [63] O. Niederhauser, M. Mangold, R. Schubel, E. A. Kuszniir, D. Schmidt, and C. Hertel, "NGF ligand alters NGF signaling via p75(NTR) and TrkA," *J. Neurosci. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 263–272, 2000.
 - [64] Y. Sakamoto, Y. Kitajima, G. Edakuni, and K. Miyazaki, "Combined evaluation of NGF and p75NGFR expression is a biomarker for predicting prognosis in human invasive ductal breast carcinoma," *Oncol. Rep.*, vol. 8, no. 5, pp. 973–980, 2001.
 - [65] R. Romon, E. Adriaenssens, C. Lagadec, E. Germain, H. Hondermarck, and X. Le Bourhis, "Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways," *Mol. Cancer*, vol. 9, p. 157, 2010.
 - [66] A. Vaishnavi, A. Le, and R. Doebele, "TRKing down an old oncogene in a new era of

- targeted therapy," *Cancer Discov.*, vol. 27, no. 3, pp. 320–331, 2015.
- [67] H. Tan *et al.*, "Nerve growth factor promotes expression of costimulatory molecules and release of cytokines in dendritic cells involved in Th2 response through LPS-induced p75NTR," *J. Asthma*, vol. 53, no. 10, pp. 989–998, 2016.
 - [68] O. Noga *et al.*, "Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 37, no. 11, pp. 1701–1708, 2007.
 - [69] Y. Jiang *et al.*, "TLR4 signaling induces functional nerve growth factor receptor p75NTR on mouse dendritic cells via p38MAPK and NF- κ B pathways," *Mol. Immunol.*, vol. 45, no. 6, pp. 1557–1566, 2008.
 - [70] Y. Jiang, G. Chen, Y. Zhang, L. Lu, S. Liu, and X. Cao, "Nerve Growth Factor Promotes TLR4 Signaling-Induced Maturation of Human Dendritic Cells In Vitro through Inducible p75," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 9, pp. 6297–6304, 2007.
 - [71] E. Garaci *et al.*, "Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 24, pp. 14013–8, 1999.
 - [72] N. Karthaus, R. Torensma, and J. Tel, "Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 181, no. 3, pp. 733–742, 2012.
 - [73] J. M. T. Janco, P. Lamichhane, L. Karyampudi, and Keith L. Knutson, "TUMOR-INFILTRATING DENDRITIC CELLS IN CANCER PATHOGENESIS," vol. 194, no. 7, pp. 2985–2991, 2016.
 - [74] N. Hanke, D. Alizadeh, E. Katsanis, and N. Larmonier, "Dendritic cell tumor killing activity and its potential applications in cancer immunotherapy.," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–21, 2013.
 - [75] V. Bigley, D. Barge, and M. Collin, "Dendritic cell analysis in primary immunodeficiency," *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 16, no. 6, 2016.
 - [76] J. Krempski *et al.*, "Tumor Infiltrating PD-1+ Dendritic Cells Mediate Immune Suppression in Ovarian Cancer," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 12, pp. 6905–6913, 2012.
 - [77] C.-Y. Mu, J.-A. Huang, Y. Chen, C. Chen, and X.-G. Zhang, "High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation," pp. 682–688, 2011.
 - [78] D. Llopiz *et al.*, "IL-10 expression defines an immunosuppressive dendritic cell population induced by antitumor therapeutic vaccination," *Oncotarget*, vol. 8, no. 2, pp. 2659–2671, 2017.
 - [79] S. M. Kiertscher, J. Luo, S. M. Dubinett, and M. D. Roth, "Tumors Promote Altered Maturation and Early Apoptosis of Monocyte-Derived Dendritic Cells," 2018.
 - [80] P. Wu, D. Wu, L. Li, Y. Chai, and J. Huang, "PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–15, 2015.
 - [81] S. P. D'Angelo *et al.*, "Efficacy and safety of first-line avelumab treatment in patients with stage IV metastatic merkel cell carcinoma a preplanned interim analysis of a clinical trial," *JAMA Oncol.*, vol. 4, no. 9, pp. 1–5, 2018.
 - [82] S. L. Topalian *et al.*, "Nivolumab (Nivo) as neoadjuvant therapy in patients with resectable Merkel cell carcinoma (MCC) in CheckMate 358.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 15_suppl, p. 9505, May 2018.
 - [83] T. Sacha, "Imatinib in chronic myeloid leukemia: An overview," *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 6, no. 1, 2014.
 - [84] A. Drilon *et al.*, "Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children," *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, no. 8, pp. 731–739, 2018.
 - [85] H. Tanaka *et al.*, "Selective TRK inhibitor CH7057288 against TRK fusion-driven cancer," *Mol. Cancer Ther.*, p. molcanther.1180.2017, 2018.
 - [86] A. Drilon *et al.*, "A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors," *Cancer Discov.*, vol. 7, no. 9, pp. 963–972, 2018.
 - [87] K. F. Bol *et al.*, "The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells," *J. Immunother. Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2019.

Tabellen und Abbildungen

<u>Tabelle 1</u>	TNM-Klassifikation des Merkelzellkarzinoms – nach der Union Internationale Contre le Cancer (7. Edition)	S.6
<u>Tabelle 2</u>	Stadieneinteilung des Merkelzellkarzinoms – nach der Union Internationale Contre le Cancer (7. Edition)	S.7
<u>Tabelle 3</u>	Übersicht der in der Untersuchung verwendeten Antikörper zur Färbung der Merkelzellkarzinombiopsien	S.13
<u>Tabelle 4</u>	Geschlecht und medianes Alter des Patientenkollektivs	S.17
<u>Tabelle 5</u>	Lokalisation und Durchmesser des Primärtumors	S.17
<u>Tabelle 6</u>	Nachweis von Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) im Tumor	S.17
<u>Tabelle 7</u>	Zweitmalignom, Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB) und Fernmetastasen	S.18
<u>Tabelle 8</u>	TNM-Status des Gesamtkollektivs nach UICC-Klassifikation	S.18
<u>Tabelle 9</u>	Ergebnisdarstellung: Gesamtüberleben und krankheits-spezifisches Überleben	S.31
<u>Abbildung 1</u>	Der NGF/TrkA/p75-Signalwegs nach Molloy et al.	S.10
<u>Abbildung 2</u>	Expression von Zytokeratin 20 (CK20), Synaptophysin (SYN) und Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) auf Tumorzellen	S.19
<u>Abbildung 3</u>	Merkelzell Polyomavirus (MCPyV) auf Tumorzellen	S.19
<u>Abbildung 4</u>	Dichte der Infiltration von Entzündungszellen ins Tumorgewebe	S.20
<u>Abbildung 5</u>	Expression von CD68 auf spindelförmigen Stromazellen	S.20
<u>Abbildung 6</u>	Expression von Programmed cell death protein 1 (PD-1) auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen	S.21
<u>Abbildung 7</u>	Expression von Programmed cell death protein 1 (PD-1) auf Lymphozyten	S.21
<u>Abbildung 8</u>	Expression von Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) durch Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen	S.22
<u>Abbildung 9</u>	Expression von Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) durch CD68+ Spindelzellen	S.22
<u>Abbildung 10</u>	Expression von Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) durch CD68+ Spindelzellen	S.23
<u>Abbildung 11</u>	Expression von Nerve Growth Factor (NGF) durch Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen	S.23

<u>Abbildung 12</u>	Expression von Nerve Growth Factor (NGF) durch CD68+ Spindelzellen	S.24
<u>Abbildung 13</u>	Expression von Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen	S.24
<u>Abbildung 14</u>	Expression von Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) auf Tumorzellen	S.25
<u>Abbildung 15</u>	Expression von Neurotrophinrezeptor p75 (p75) auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen	S.25
<u>Abbildung 16</u>	Zusammenfassende Darstellung der Antikörperexpression auf Tumorzellen, Lymphozyten und CD68+ Spindelzellen	S.26
<u>Abbildung 17</u>	Zusammenfassende Darstellung der Antikörperfärbungen	S.26
<u>Abbildung 18</u>	Anordnung von peritumoralen Stromazellen zu Tumorzellen und Markerexpression	S.27
<u>Abbildung 19</u>	Kaplan-Meier Überlebenskurven für medianes Gesamtüberleben und krankheitsspezifisches Überleben in Korrelation zur Expression von Programmed cell death protein 1 (PD-1), Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1) und Nerve Growth Factor (NGF)	S.29

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Friederike Egberts bedanken, die die Erarbeitung meiner Dissertation unter ihrer Leitung ermöglichte. Ihre mutmachende Art auf fachlicher und persönlicher Ebene sowie ihr steter Beistand haben erst die Vollendung dieser Arbeit ermöglicht.

Ausdrücklich will ich mich auch bei meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. Ulrike Wehkamp danken, die unermüdlich und mit vollem Einsatz für das Voranschreiten der Arbeit gewirkt hat. Sie stand zuverlässig mit Rat und Tat an meiner Seite. Sowohl Frau Prof. Dr. Friederike Egberts als auch Frau Dr. Ulrike Wehkamp waren bis zuletzt jederzeit für mich ansprechbar und nahmen ihre Rolle in der Betreuung meiner Dissertation intensiv wahr.

Mein Dank gilt auch dem Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Kiel, Herr Prof. Dr. Christoph Röcken, welcher eine kompetente fachliche Unterstützung war und in dessen Zusammenarbeit die Durchführung der Arbeit möglich wurde.

Überdies danke ich Frau Sandra Krüger, ebenfalls aus dem Institut für Pathologie. Als medizinische Fachangestellte leistete sie nicht nur die laborchemischen Arbeiten für die Dissertation, sondern beriet mich auch in technischen und inhaltlichen Fragen.

Zuletzt möchte ich meinen Angehörigen danken. Vor allem meine Eltern standen über die Jahre als emotionale und Mut machende Unterstützung immer hinter mir. Sie begleiteten mich auch hierbei mit vollem Rückhalt, wie schon während meines ganzen Lebens. Ebenso möchte ich mich meinem Partner danken, der immer liebevoll und kraftspendend an meiner Seite stand und mir half jegliche Hürde zu nehmen. Seine und die Unterstützung meiner Eltern waren und werden immer das Wichtigste für mich sein.

Anhang

Anhang 1 – Datenerhebungsbogen+

**Untersuchung zur
Mutationsstatus beim Merkelzell-Karzinom (MCC)**

- Dokumentation -

Laufende Nummer: ____ / ____

Nachname: _____ Vorname: _____ m / w

Geburtsdatum: / ____ / ____

Ia. Basisdaten

Unbekannter Primärtumor: ja / nein

Primärtumor: kutan / andere

Histologie: ☐ trabekulärer Typ ☐ kleinzelliger Typ ☐ intermediärer Typ
☐ Sonstiges / keine Angabe

Lokalisation: ☐ Kopf / Hals (genaue Lokalisation : _____)
☐ Rumpf
☐ Extremitäten _____
☐ andere

Erstdiagnose PT: ____ / ____ / ____ (Tag / Monat / Jahr)

Tumordurchmesser (klinisch): ☐ < 2cm ☐ > 2cm ☐ keine Angabe

klinisches Stadium bei Erstdiagnose: ☐ Ia ☐ Ib ☐ II ☐ III

(Ia: PT <2cm; Ib: PT >2cm; II: lokoregionärer Befall; III: Fernmetastasen)

Komorbidität: ja / nein _____

Immunsuppression: ja / nein _____

Ergebnis SLNB

Sentinel node (SN) gefunden: ja / nein

Anzahl: _____

Mikrometastasen gefunden: ja / nein

Kapseldurchbruch : ja / nein

Anzahl positive SN: _____

Histo wo: _____ (Praxis- / Institutsname)

Histo-Nr.: _____

CLND durchgeführt: ja /nein

Wenn ja: Datum: ____/____/____

Lokalisation: _____

(Adjuvante) Strahlentherapie Intransit / LK-Gebiet: ja / nein

Wenn ja ggf. Gray Gesamtdosis

Bemerkungen:

Ib. Histologie

Ulceration: ja / nein

Immunhisto positiv (z.B.: CK8, **CK20**, NF, Chromogranin A):

Nachweis Polyomavirus: ja / nein

Ic. Therapie Primärtumor

OP: ja / nein

Wenn ja: Datum : ____/____/____ (Tag/Monat/Jahr)

Welcher Sicherheitsabstand (in cm): _____ cm

(Adjuvante) Strahlentherapie Primärtumorgebiet: ja / nein

Wenn ja ggf. Gray Gesamtdosis

SLNB durchgeführt: ja / nein

Wenn ja: Datum: ____/____/____

Anzahl LK-Stationen: 1 Station / 2 Stationen /3 Stationen

Welche Stationen: cervikal / axillär / sonstige:

II. Stadium II (lokoregionäres Rezidiv/lokoregionäre LK-Metastasierung)

Erstdiagnose: ____ / ____ / ____ (Tag / Monat / Jahr)

Bemerkungen:

Stadium III (Fernmetastasierung)

Erstdiagnose : ____ / ____ / ____ (Tag / Monat / Jahr)

Alter: ____ J.

Allgemeinzustand:

ECOG: Grad 0 / 1 / 2 / 3 / 4

Lokalisation der Fernmetastasen:

- ☐ Haut
- ☐ Lunge
- ☐ Leber
- ☐ Gehirn
- ☐ Skelett
- ☐ LK-Fern
- ☐ andere

Fernmetastasierung histologisch bestätigt? ☐ ja ☐ nein ☐ unklar

Therapien im Stadium III (Fernmetastasierung): Ja / nein

Name des verwendeten Präparats

Endauswertung

Patient lebt: ja / nein

letzte Vorstellung: ____ / ____ / ____

Datum der letzten Dokumentation: ____ / ____ / ____

☐ verstorbener Patient

Sterbedatum: ____ / ____ / ____

Todesursache: ☐ Tumor

☐ Therapienebenwirkungen:

.....

☐ Sonstige:

.....

Veröffentlichungen

Tropomyosin Receptor Kinase A Expression on Merkel Cell Carcinoma Cells

Ulrike Wehkamp, MD; Sophie Stern; Sandra Krüger; Axel Hauschild, MD; Christoph Röcken, MD; Friederike Egberts, MD

IMPORTANCE Merkel cell carcinoma (MCC) is a malignant neuroendocrine skin tumor frequently associated with the Merkel cell polyomavirus. Immune checkpoint therapy showed remarkable results, although not all patients are responsive to this therapy. Anti-tropomyosin receptor kinase A (TrkA)-targeted treatment has shown promising results in several tumor entities.

OBJECTIVE To determine TrkA expression in MCC as a rationale for potential targeted therapy.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This case series study investigated the MCC specimens of 55 patients treated at the Department of Dermatology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany, from January 1, 2005, through December 31, 2015. Thirty-nine of the 55 samples were suitable for further histopathologic examination. Expression of TrkA was explored by immunohistochemical analysis.

EXPOSURE Diagnosis of MCC was confirmed by staining positive for cytokeratin 20 (CK20) and synaptophysin.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Expression of TrkA on the tumor cells.

RESULTS Specimens of 39 patients (21 women and 18 men; mean [SD] age, 75.0 [7.8] years) underwent immunohistochemical investigation. Thirty-eight of 38 specimens expressed CK20 and synaptophysin on the MCC tumor cells (100% expression). Merkel cell polyomavirus was detected in 32 of 38 specimens (84%). Tropomyosin receptor kinase A was found in all 36 evaluable specimens on the tumor cells; 34 (94%) showed a weak and 2 (6%) showed a strong cytoplasmic expression. In addition, strongly positive perinuclear dots were observed in 30 of 36 specimens (83%).

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Tropomyosin receptor kinase A was expressed on MCC tumor cells in 100% of evaluable specimens. This result may lead to the exploration of new targeted treatment options in MCC, especially for patients who do not respond to anti-programmed cell death protein 1 treatment.

JAMA Dermatol. doi:10.1001/jamadermatol.2017.2495
Published online August 9, 2017.

Author Affiliations: Department of Dermatology, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany (Wehkamp, Stern, Hauschild, Egberts); Department of Pathology, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany (Krüger, Röcken).

Corresponding Author: Friederike Egberts, MD, Department of Dermatology, University Hospital Schleswig-Holstein, Rosalind-Franklin-Strasse 7, 24105 Kiel, Germany (fegberts@dermatology.uni-kiel.de).

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare, highly malignant, mostly asymptomatic, and rapidly expanding neuroendocrine tumor of the skin of older (>50 years) individuals that is frequently associated with Merkel cell polyomavirus, UV exposure, and immunosuppression.^{1,2} High incidence of local recurrence is characteristic, as is early regional lymph node and possible distant metastasis.³ In stage IV disease, the 2-year survival rate is only 26%.⁴ These characteristics illustrate the need for detection of tumor-specific pathways and possible therapeutic targets.

Several mechanisms are known to be relevant in immune response in tumor tissue. For example, viral infection usually induces an immune response, and malignant tumors with viral infection, such as MCC, eventually necessitate effective ways of immune escape mechanisms to progress. The recent development of immune checkpoint inhibitors targeting programmed cell death protein 1 and programmed death ligand 1 have shown response rates of 56% in patients with MCC.⁵ However, a substantial number of patients still do not show a response. Obviously, the programmed cell death protein 1 pathway (regulating the adaptive immune response) is not the only mechanism of immune escape in MCC.⁶ Tropomyosin receptor kinase (Trk) pathway aberrations, including protein overexpression, have been reported in several cancer types, such as breast and colorectal cancer, and selective inhibition of Trk signaling has shown encouraging interim results in ongoing phase 2 trials.⁷ In this study, we explored the expression and putative significance of TrkA as a potential mediator of cell survival and treatment target in patients with MCC.

Methods

The case series study consisted of 55 patients with MCC who were treated at the Department of Dermatology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany, from January 1, 2005, through December 31, 2015. For all patients, clinical information and survival data were collected from clinical records. Written informed consent was obtained from patient interviews or questionnaires sent to family clinicians. The study protocol was approved by the ethics review committee of University Hospital of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany.

Histopathologic Evaluation

In total, 39 formalin-fixed and paraffin-embedded tumor samples were investigated. Deparaffinized sections were stained with hematoxylin-eosin. All cases were investigated for expression of cytokeratin 20, synaptophysin, and Merkel cell polyomavirus at a dilution of 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) using standard protocols and were reviewed by 3 of us who were expert pathologists and dermatopathologists (U.W., C.R., and F.E.) to confirm the diagnosis of MCC. Immunostaining was performed manually using a rabbit monoclonal TrkA antibody at a dilution of 1:200 (Abcam). The identification and characterization of the expressing cells were performed based on histomorphologic criteria. For the identification of cells belonging to the mononuclear phagocyte system, additional CD68 routine immunostains were

Key Points

Question Is tropomyosin receptor kinase A expressed in Merkel cell carcinoma?

Findings In this case series study, tropomyosin receptor kinase A expression on tumor cells was detected in every evaluable case of Merkel cell carcinoma.

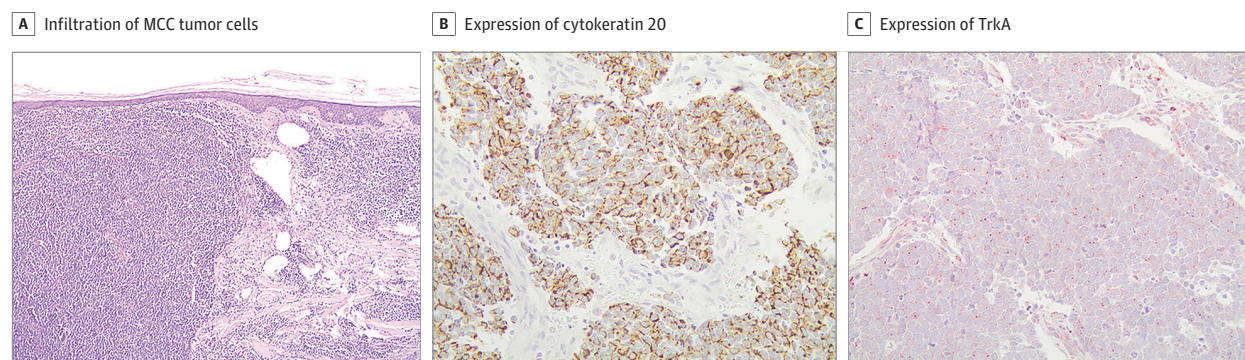
Meaning Expression of tropomyosin receptor kinase A on tumor cells in Merkel cell carcinoma may be a rationale for targeted therapy.

Table. Clinical Characteristics of the Patient Cohort

Characteristic	Data (N = 39) ^a
Sex	
Female	21/39 (54)
Male	18/39 (46)
Age, mean (SD) [range], y	
Total	75.0 (7.8) [58-88]
Female	75.2 (8.1) [58-88]
Male	75.0 (7.5) [63-88]
Localization	
Head and/or neck	14/38 (37)
Trunk	3/38 (8)
Extremities	21/38 (55)
Diameter of tumor, cm	
<2	19/33 (58)
2 to 5	14/33 (42)
>5	0
Expression of MCPyV	
Positive	32/38 (84)
Negative	6/38 (16)
Immunosuppression	3/39 (8)
Sentinel node positive	6/23 (26)
Distant metastasis	
Skin	1/38 (3)
Lymph node	7/38 (18)
Organ	4/38 (11)
Second malignant neoplasm	16/38 (42)
T stage	
Tis	0/33
T1	19/33 (58)
T2	14/33 (42)
T3	0/33
T4	0/33
N stage	
N0	26/33 (79)
N1a	6/33 (18)
N1b	1/33 (3)
N2	0/33
M stage	
M0	32/33 (97)
M1a	1/33 (3)
M1b	0/33
M1c	0/33

Abbreviation: MCPyV, Merkel cell polyomavirus.

^a Unless otherwise indicated, data are expressed as number of patients/number of patients with evaluable specimens (percentage).

Figure. Histopathologic Findings of a Representative Case of Merkel Cell Carcinoma (MCC)

Dense infiltration of tumor cells of MCC within the dermis with expression of cytokeratin 20 and typical perinuclear dots are observed. The tumor cell stain is positive for tropomyosin receptor kinase A (TrkA). Original magnification, ×10 (hematoxylin-eosin) in A, ×20 (cytokeratin 20) in B, and ×40 (TrkA) in C.

applied. Expression levels were scored by visual inspection as strong, intermediate, weak, or no expression. The tumor surrounding and infiltrating inflammatory cells was rated as low, moderate, or dense.

Results

Clinical Features

A total of 39 patients (21 women and 18 men; mean [SD] age, 75.0 [7.8] years) were included. The clinical patient characteristics are depicted in the **Table**. Secondary malignant neoplasms, including other skin tumors (squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma), were documented in 16 of 38 patients (42%) with available data. In this group, skin tumors accounted for 12 of 38 specimens (32%). Four of 38 patients (11%) had basal cell carcinoma in addition to another neoplasia of the visceral organs. These patients were counted only once for the calculations.

Histopathologic Evaluation

In 39 cases, the material was suitable for immunohistochemical analyses, which were performed in addition to routine hematoxylin-eosin staining. Thirty-eight of 38 MCCs (100%) expressed CK20 and synaptophysin on the tumor cells (**Figure**). Merkel cell polyomavirus was detected in 32 of 38 evaluable specimens (84%).

Tropomyosin Receptor Kinase A

Tumor cells were positive for TrkA in 36 of 36 patients (100%) with evaluable specimens, with a weak cytoplasmic expression in 34 (94%) and a strong cytoplasmic expression in 2 (6%). In addition, strongly positive perinuclear dots were observed in 30 of the 36 specimens (83%) (**Figure**). Staining results were considered to be positive if more than 50% of the tumor cells expressed TrkA.

Inflammatory Infiltrate

The density of the tumor surrounding and infiltrating inflammatory cells was low in 17 of 39 specimens (44%), moderate

in 16 (41%), and dense in 6 (15%). In all cases, CD68-positive cells were in a spindle cell configuration surrounding the tumor cell complexes.

Discussion

For the first time, to our knowledge, we describe the expression of TrkA in MCC. In all evaluable specimens in our study, TrkA was present on MCC tumor cells. Thus, the inhibition of TrkA seems to be an interesting target as a future treatment option.^{7,8} The development of TrkA inhibitors such as NMS-P626 and their use in mice have shown remarkable anti-tumor activity. These data are encouraging, and studies in human patients are necessary to evaluate possible beneficial effects. First-interim results of ongoing phase 2 trials have shown rapid responses.^{9,10} According to clinicaltrials.gov, 4 studies¹¹⁻¹⁴ are recruiting for the systemic application of a TrkA inhibitor (larotrectinib [LOXO-101]) to treat advanced solid tumors and pediatric cases. Completion of the studies is envisaged within the next 12 to 18 months. As we demonstrate in our present analysis, MCC tumor cells express TrkA and therefore could be ideal candidates for beneficial effects exerted by TrkA inhibition. The immune system is known to play a critical role in tumor defense and control. Thus, our attention was directed not only to TrkA expression but also to the immune infiltrate. We found that the MCC tumor tissue is surrounded by tumor-associated immune cells (TAIC) that express CD68. The term TAIC is used synonymously with interdigitating dendritic cells. Most likely, the CD68⁺ spindle cells detected in our analysis represent interdigitating dendritic cells, which are part of the antigen-presenting system and belong to the most potent stimulators for naive T lymphocytes.¹⁵ We observed a rimming morphology of the TAIC around the tumor cell complexes, which is suggestive of an interaction between tumor cells and TAIC. Additional functional studies are required to elucidate whether a connection between the tumor and its microenvironment exists that might be a relevant factor for triggering this morphologic correlate.

Tropomyosin receptor kinase A, activated by its ligand nerve growth factor, may block T cells via the same pathways as programmed cell death protein 1 and programmed death ligand 1.^{16,17} Interaction between nerve growth factor and TrkA is responsible for the survival of neural cells.^{18,19} If cell survival is promoted by this interaction, it could also be an important mechanism for tumor cell survival.

Limitations

A limitation of the present study is the limited number of evaluable cases. Therefore, the validation of our results in an independent cohort would be of interest.

Conclusions

Our study shows for the first time, to our knowledge, the expression of TrkA on MCC tumor cells. Exploring anti-TrkA treatment could be interesting with respect to the high expression on tumor cells in patients with MCC. In addition, the morphologic finding of the arrangement of the TAIC rimming around the tumor is interesting and might be important for the understanding of immune escape mechanisms. Additional studies are necessary to confirm our findings and to elucidate the role of marker expression on tumor cells.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: May 30, 2017.

Published Online: August 9, 2017.

doi:10.1001/jamadermatol.2017.2495

Author Contributions: Drs Wehkamp and Egberts had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: All authors.

Acquisition, analysis, or interpretation of data:

Wehkamp, Stern, Hauschild, Röcken, Egberts.

Drafting of the manuscript: Wehkamp, Stern, Hauschild, Röcken, Egberts.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Krüger, Hauschild, Röcken.

Statistical analysis: Wehkamp.

Administrative, technical, or material support: Stern, Krüger, Röcken.

Study supervision: Wehkamp, Krüger, Hauschild, Röcken, Egberts.

Conflict of Interest Disclosures: Dr Hauschild reports receiving funding for consultancies and honoraria and grants from Amgen, BMS, Celgene, Eisai, GSK, MedImmune, MelaSciences, Merck Serono, MSD/Merck, Novartis, Oncosec, and Roche Pharma. No other disclosures were reported.

Additional Contributions: Arne Voss, MEd, Department of Dermatology, University-Hospital Schleswig-Holstein, helped with image editing. He was not compensated for this work.

REFERENCES

1. Santos-Juanes J, Fernández-Vega I, Fuentes N, et al. Merkel cell carcinoma and Merkel cell polyomavirus: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2015;173(1):42-49.

2. Miller RW, Rabkin CS. Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(2):153-158.

3. Coit DG. Merkel cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2001;8(9)(suppl):99S-102S.

4. Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(5):751-761.

5. Patnaik A, Kang SP, Rasco D, et al. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2015;21(19):4286-4293.

6. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*. 2009;229(1):114-125.

7. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000023.

8. Bailey JJ, Schirmacher R, Farrell K, Bernard-Gauthier V. Tropomyosin receptor kinase inhibitors: an updated patent review for 2010-2016—part II. *Expert Opin Ther Pat*. 2017;27(7):831-849.

9. Ardini E, Bosotti R, Borgia AL, et al. The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TrkA kinase inhibition. *Mol Oncol*. 2014;8(8):1495-1507.

10. Passiglia F, Caparica R, Giovannetti E, et al. The potential of neurotrophic tyrosine kinase (NTRK) inhibitors for treating lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016;25(4):385-392.

11. ClinicalTrials.gov. Oral TRK Inhibitor LOXO-101 for Treatment of Advanced Adult Solid Tumors. NCT02122913. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02122913>. Accessed January 17, 2017.

12. ClinicalTrials.gov. Oral TRK Inhibitor LOXO-101 (Larotrectinib) for Treatment of Advanced Pediatric Solid or Primary Central Nervous System Tumors. NCT02637687. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02637687>. Accessed January 17, 2017.

13. ClinicalTrials.gov. Study of LOXO-101 (Larotrectinib) in Subjects With NTRK Fusion Positive Solid Tumors (NAVIGATE). NCT02576431. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02576431>. Accessed January 17, 2017.

14. ClinicalTrials.gov. Expanded Access to Provide Larotrectinib (LOXO-101) for the Treatment of Cancers With a NTRK Gene Fusion. NCT03025360. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03025360>. Accessed January 17, 2017.

15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252.

16. Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Adv Biol Regul*. 2015;58:16-27.

17. Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*. 1991;252(5005):554-558.

18. Freidin MM. Antibody to the extracellular domain of the low affinity NGF receptor stimulates p75(NGFR)-mediated apoptosis in cultured sympathetic neurons. *J Neurosci Res*. 2001;64(4):331-340.

19. Marlin MC, Li G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:239-257.

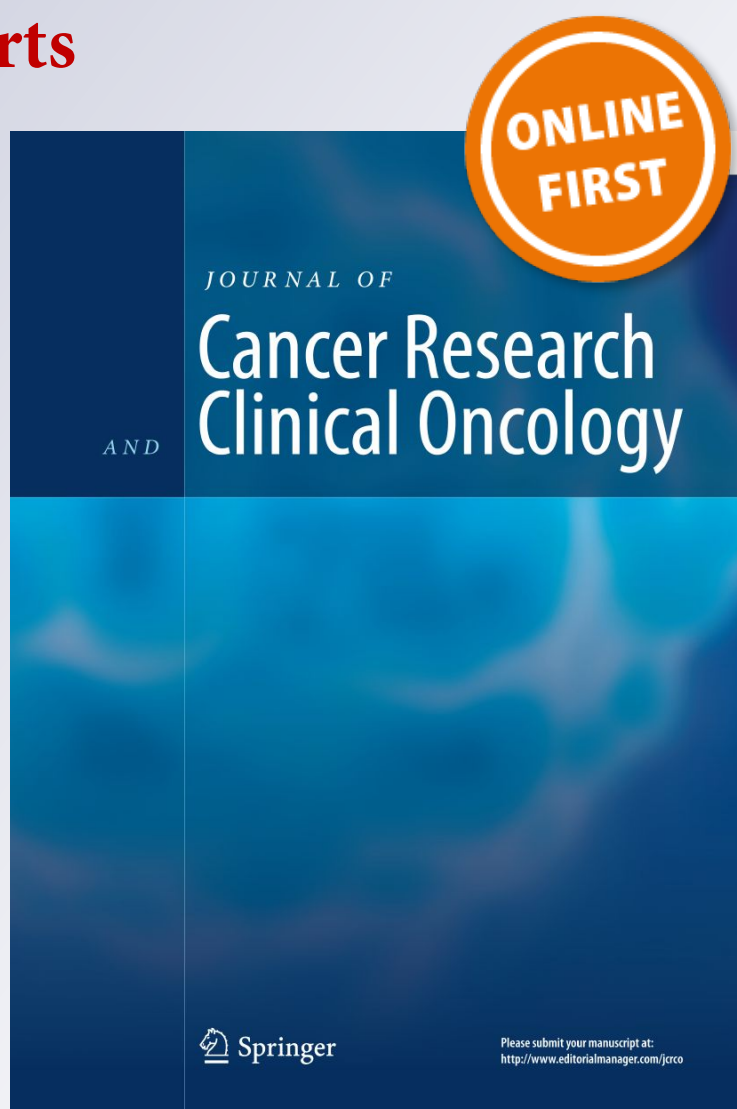
Co-expression of NGF and PD-L1 on tumor-associated immune cells in the microenvironment of Merkel cell carcinoma

**Ulrike Wehkamp, Sophie Stern,
Sandra Krüger, Michael Weichenthal,
Axel Hauschild, Christoph Röcken &
Friederike Egberts**

**Journal of Cancer Research and
Clinical Oncology**

ISSN 0171-5216

J Cancer Res Clin Oncol
DOI 10.1007/s00432-018-2657-x



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Co-expression of NGF and PD-L1 on tumor-associated immune cells in the microenvironment of Merkel cell carcinoma

Ulrike Wehkamp¹ · Sophie Stern¹ · Sandra Krüger² · Michael Weichenthal¹ · Axel Hauschild¹ · Christoph Röcken² · Friederike Egberts¹

Received: 17 January 2018 / Accepted: 2 May 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Merkel cell carcinoma (MCC) is a malignant neuroendocrine skin tumor with known viral association. The microenvironment and its interaction with the tumor via the programmed cell death protein 1 (PD-1) pathway are crucial for response to anti-PD-1/anti-PD-L1 treatments. However, not all patients respond, which is suggestive of additional mechanisms for tumor growth and/or persistence. We previously detected tropomyosin receptor kinase A (TrkA) expression on MCC tumor cells and, therefore, gained interest in the expression of its ligand nerve growth factor (NGF).

Methods Thirty-nine patients from our department were studied for immunohistochemical NGF, PD-1, and PD-L1 expression and clinico-pathological correlation.

Results PD-L1 was expressed on the tumor cells in 42%. In 95%, PD-L1 expression was also found on CD68+ spindle cells at the tumor border, which co-expressed NGF in 71%. 66% contained PD-1+ tumor infiltrating lymphocytes. PD-1, PD-L1, and NGF expression seems to correlate with a worse outcome.

Conclusions The present study shows that PD-L1 and NGF are co-expressed on spindle cells in the microenvironment. The expression of NGF might be a link of the microenvironment to the TrkA-positive tumor cells. Whether this mechanism is critical for tumor growth and lack of response to anti-PD-1/L1 treatment has to be investigated in further studies.

Keywords NGF · Merkel cell carcinoma · PD-L1 · PD-1 · TrkA

Introduction

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare highly malignant tumor of the skin, presumably of neuroendocrine origin, frequently associated with Merkel cell polyoma virus (McPyV) (Santos-Juanes et al. 2015). Known risk factors are UV exposure and immunosuppression. MCCs commonly occur in sun-exposed areas of the skin, i.e., head, neck, and extremities, and affect predominantly older male caucasians (Miller and Rabkin 1999). High incidence of local recurrence and early regional lymph node are characteristic; distant metastasis is possible (Coit 2001). In stage IV disease, the 2-year survival rate is only 26% (Lemos et al. 2010).

This illustrates the need for the detection of tumor-specific pathways and possible therapeutic targets. The underlying mechanism of the escape of immune surveillance in MCC is not yet known.

The updated guidelines from the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) for MCC in advanced disease stages recommend study inclusion, chemotherapy, radiation, and surgery, respectively (Bichakjian et al. 2014). Pembrolizumab, a programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitor, is included as another treatment option, and recently, Avelumab (anti-programmed-death ligand 1 – PD-L1) has been approved for metastatic MCC (Kaufman et al. 2016).

PD-1 and PD-L1 inhibitor trials showed response rates in metastatic MCC patients between 31 and 56% (Kaufman et al. 2016; Patnaik et al. 2015). This raises hopes, although a substantial number of patients still fail to respond, and suggests that the PD-1 pathway might be not the only mechanism of immune escape. PD-1 is known to regulate the adaptive immune response. Ligand binding of PD-L1 and PD-L2 leads to a decrease of T-cell proliferation and cytokine production

✉ Ulrike Wehkamp
uwehkamp@dermatology.uni-kiel.de

¹ Department of Dermatology, University-Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany

² Institute of Pathology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

(Riley 2009). Yet, the interaction and pathway regulation are not completely understood. In most cancer types, PD-L1 expression on tumor cells and PD-1 on the tumor infiltrating lymphocytes (TILs) is reported (Kluger et al. 2015; Kostine et al. 2016). Still, the amount of PD-L1 is described to be in very low ranges (standard cutoff: 1%) (Kaufman et al. 2016). In a previous study, we could show that tropomyosin receptor kinase A (TrkA) is expressed in all cases of MCC on the tumor cells (Wehkamp et al. 2017). TrkA is a potential target in several kinds of solid tumors and is currently under investigation in phase 2/3 studies (*clinicaltrials.gov*) (Amatu et al. 2016; Drilon et al. 2017). The ligand of TrkA is nerve growth factor (NGF), which is essential for the maintenance, differentiation, and growth of neural cells, and regulates parts of the immune system (Levi-Montalcini 1987; Marlin and Li 2015). Two types of NGF receptors have been identified, a low-affinity receptor, p75 neurotrophin receptor (p75NTR), and a high-affinity receptor, TrkA (Bradshaw et al. 2015; Kaplan et al. 1991). NGF–p75NTR interaction is known to play an important role in apoptosis, whereas NGF–TrkA interaction is responsible for the survival of neural cells (Freidin 2001; Marlin and Li 2015). In breast cancer, NGF expression was associated with significantly poorer disease-free survival rates and might be used as a predictive factor in these patients (Sakamoto et al. 2001). Because of the known TrkA expression in MCC, we aimed in the present study to explore the expression and putative biological significance of NGF, PD-1, and PD-L1 in MCC.

Materials and methods

Patients and specimens

The study cohort in this retrospective trial consisted of 39 patients with MCC, treated at the Department of Dermatology, University Hospital of Schleswig–Holstein, Campus Kiel, between 2005 and 2015.

For all patients, clinical information, tumor-specific data at initial diagnosis, treatment, and survival data were collected from clinical charts. The current TNM-classification was used. Follow-up information was obtained from patient interviews or questionnaires sent to family practitioners. The study protocol was approved by the local ethics review committee (file number: D 483/16).

Histopathological evaluation

In total, 39 formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tumor samples were investigated. Deparaffinized sections were stained with hematoxylin and eosin. All cases were reviewed by expert pathologists and dermatopathologists (CR, FE, and UW) to confirm the diagnosis according to the

current histopathological and immunohistochemical criteria. All cases were investigated for the expression of cytokeratin 20, synaptophysin and McPyV using the standard protocols. Immunostaining was carried out manually, using a rabbit monoclonal anti-PD-L1 antibody (1:75, E1L3N, Cell Signaling, Danvers, United States of America). Tissue sections were pretreated in citrate buffer for antigen retrieval and incubated with hydrogen peroxide block and Ultra V Block (both Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). For visualization the ImmPRESS-HRP-Universal—Antibody Polymer and the NovaRED substrate kit (both VectorLabs, Peterborough, United Kingdom) were applied. Counterstaining was performed with hematoxylin (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG; Leipzig, Germany). For NGF (1:200, Abcam, Cambridge, UK), p75NTR (1:100, Abcam, Cambridge, UK) and PD-1 (1:50, CellSignaling, Danvers, USA) manual staining protocols were established, applying identical tissue preparation as detailed for PD-L1. The identification and characterization of the expressing cells were performed based on histomorphological criteria. For the identification of cells belonging to the mononuclear phagocyte system, additional CD68 routine immunostains were applied. Expression levels were scored by visual inspection (strong, intermediate, weak, and no expression). The tumor surrounding and infiltrating inflammatory cell infiltrate was rated into three categories (low, moderate, and dense). The category ‘low’ was applied for minimal inflammatory infiltrations consisting of only a few inflammatory cells. If conglomerates of inflammatory cells that also infiltrated between tumor tissues were seen, this was categorized as ‘dense’. Intermediate inflammatory infiltration was defined as ‘moderate’.

Study design

Whole-tissue sections from MCC were stained with antibodies directed against NGF, PD-L1 and PD-1. The staining results were correlated with clinico-pathological and survival data.

Statistical methods and comparison of clinical parameters

The survival calculations were performed with a Kaplan–Meier analysis. For group comparisons and correlation analyses, the parameters were tested for statistically significant differences by a two-sided *t* test, Fisher’s exact test and Chi-square test, respectively (*p* value < 0.05). The correlation analysis between the immunostains was corrected for multiple testing and considered significant, if *p* < 0.05. For all calculations, the GraphPad Prism software (version 7) was used (GraphPad, LaJolla, USA).

Results

Clinical features

The clinical patients' characteristics are depicted in Table 1. The cohort included 39 patients consisting of 21 (54%)

women and 18 (46%) men with a median age of 75 years (range 58–88 years). Immunosuppression and secondary malignancies including other skin tumors (squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma) were documented in 7.7% (3/39) and 42.1% (16/38), respectively. Within the latter, skin tumors accounted for 31.6% (12/38). 10.5% (4/38)

Table 1 Clinical characteristics of patient cohort and of patients with expression of PD-1± (on lymphocytes) and NGF± (on tumor-associated immune cells) (*n*=39)

	Total <i>N</i> =39 (100%)	PD-1+ <i>N</i> =23 (59.0%)	PD-1– <i>N</i> =12 (30.8%)	<i>p</i> value	NGF+ <i>N</i> =24 (61.5%)	NGF– <i>N</i> =10 (25.6%)	<i>p</i> value
Sex (<i>N</i>=39)				0.476			0.457
Female	21 (53.9%)	11 (47.8%)	8 (66.7%)		14 (58.3%)	4 (40.0%)	
Male	18 (46.1%)	12 (52.2%)	4 (33.3%)		10 (41.7%)	6 (60.0%)	
Median age (range)	75 (58–88)	73 (58–88)	73.5 (64–83)	0.989	72.5 (59–86)	78 (58–88)	0.286
Localization (<i>N</i>=38)				0.490			0.241
Head/neck	14 (36.8%)	10 (43.5%)	3 (25%)		7 (29.2%)	6 (60.0%)	
Trunk	3 (7.9%)	1 (4.4%)	1 (8.3%)		2 (8.3%)	1 (10.0%)	
Extremities	21 (55.3%)	11 (47.8%)	8 (66.7%)		14 (58.3%)	3 (30.0%)	
Diameter of tumor (<i>N</i>=33)				0.434			0.228
< 2 cm	18 (54.5%)	9 (39.1%)	6 (50.0%)		11 (45.8%)	3 (30.0%)	
> 2–5 cm	15 (45.5%)	10 (43.5%)	4 (33.3%)		8 (33.3%)	6 (60.0%)	
> 5 cm	0	0	0		0	0	
MCPyV+ (<i>N</i>=38)	32 (84.2%)	21 (91.3%)	9 (75.0%)	0.313	20 (83.3%)	8 (80.0%)	> 0.99
MCPyV–	6 (15.8%)	2 (8.6%)	3 (25.0%)		4 (16.7%)	2 (20.0%)	
Immunosuppression (<i>N</i>=39)	3 (7.7%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	> 0.99	2 (66.7%)	1 (33.3%)	> 0.99
Sentinel node positive (<i>N</i>=23)	6 (26.1%)	2 (33.3%)	3 (50%)	0.115	4 (66.7%)	2 (33.3%)	> 0.99
Distant metastasis (<i>N</i>=38)				0.624			0.16
Skin	1 (2.6%)	1 (4.3%)	0		0	1 (10.0%)	
Lymph node	13 (46.4%)	6 (26.1%)	6 (50.0%)		9 (37.5%)	4 (40.0%)	
Organ	4 (10.5%)	2 (8.7%)	2 (16.7%)		3 (12.5%)	0	
Second malignancy (<i>N</i>=38)	16 (42.1%)	9 (39.1%)	5 (41.7%)	> 0.99	7 (29.2%)	6 (60%)	0.13
T-stage (<i>N</i>=33)				0.434			0.228
Tis	0	0	0		0	0	
T1	18 (54.5%)	9 (39.1%)	6 (50.0%)		11 (45.8%)	3 (30.0%)	
T2	15 (45.5)	10 (43.5%)	4 (33.3%)		8 (33.3%)	6 (60.0%)	
T3	0	0	0		0	0	
T4	0	0	0		0	0	
N-stage (<i>N</i>=39)				0.072			0.87
N0	26 (66.7%)	17 (73.9%)	6 (50.0%)		15 (62.5%)	6 (60.0%)	
N1a	4 (10.3%)	0	3 (25.0%)		3 (12.5%)	1 (10.0%)	
N1b	8 (20.5%)	5 (21.7%)	3 (25.0%)		5 (20.8%)	3 (30.0%)	
N2	1 (2.6%)	1 (4.4%)	0		1 (4.2%)	0	
M-stage (<i>N</i>=39)				0.78			0.503
M0	32 (82.1%)	19 (82.6%)	9 (75%)		19 (79.2%)	9 (90%)	
M1a	3 (7.6%)	2 (8.7%)	1 (8.3%)		2 (8.3%)	1 (10%)	
M1b	0	0	0		0	0	
M1c	4 ^a (10.3)	2 ^a (8.7%)	2 (16.7%)		3 (12.5%)	0	

If data were not available for all patients, numbers for patients with available data are given in brackets for every category where applicable
PD-1 programmed cell death protein 1, *NGF* nerve growth factor, *MCPyV* Merkel cell polyomavirus

^aOne of these patients had metastasis in the lung AND other visceral organs

had a basal cell carcinoma in addition to another neoplasia of visceral organs. These patients were only counted once for the calculations. For 6 patients, the size of the primary tumor was not documented and, therefore, not evaluable.

Histopathological evaluation

Immunohistochemical analyses were performed additionally to routine hematoxylin–eosin staining. The stained slides were not evaluable in every case. The number of positive and evaluable stains is given in brackets. 100% (38/38) of the MCCs expressed CK20 as well as synaptophysin on the tumor cells (Fig. 1; Table 2). MCPyV was detected in 84% (32/38).

NGF

NGF was detected in CD68+ spindle cells in 71% (24/34) and showed a membranous staining pattern (Fig. 2). In most

cases, the expression of NGF on the CD68+ cells was seen at the tumor/stroma interface or in septae reaching between tumor areas directly co-localized to the immune infiltrate. If > 5% of the cell population showed NGF expression, the staining was evaluated as positive. The actual tumor cells expressed NGF in 23.5% (8/34) with a positive staining (> 50% of tumor cells) in 18% (6/34) and a weak mostly scattered expression (10–25% of tumor cells) in 6% (2/34). NGF was not seen in lymphocytes.

PD-L1 was found in tumor as well as in immune cells. 43.2% (16/37) of the tumors were considered to express PD-L1 on the tumor cells. The cutoff for PD-L1 positivity was set at 1%, which is the standard cutoff in many studies (Kaufman et al. 2016). Applying a cutoff of 5% for positivity on the tumor cells revealed an expression > 5% in only one case (3%; 1/37). In addition, in 95% (35/37), a membranous PD-L1 expression in CD68+ spindle cells could be detected (Fig. 2). For the CD68+ spindle cells, the cutoff was set at 5%. The expression of PD-L1 was comparable to the staining pattern of NGF on the CD68+ cells at the tumor/stroma

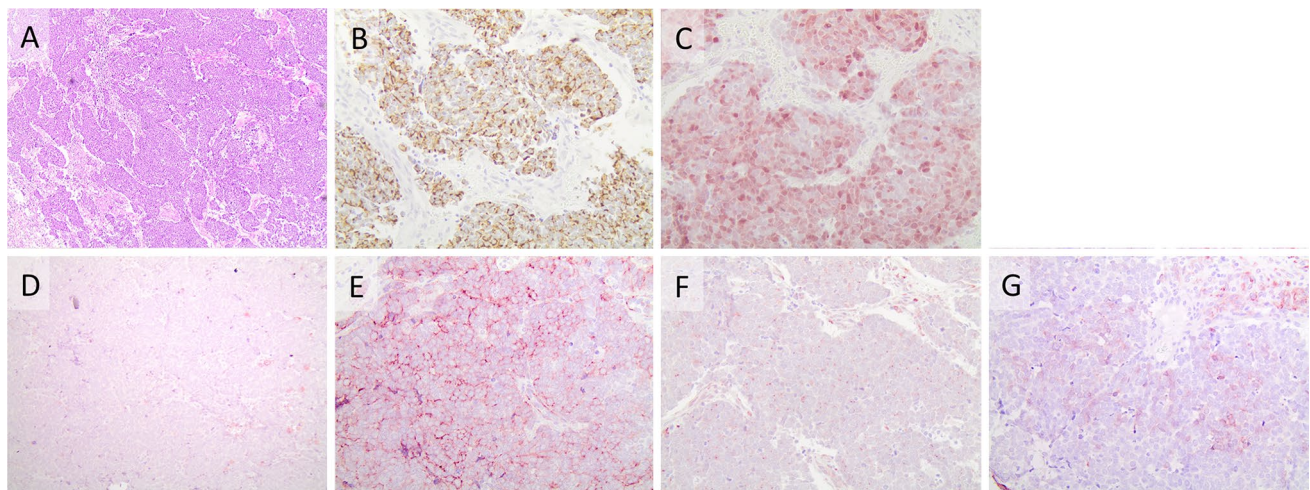


Fig. 1 Merkel cell carcinoma—histopathology of representative cases. Dense tumor infiltrates in the dermis (**a**, H&E) with expression of cytokeratin 20 and typical perinuclear dots (**b**), and positivity for Merkel cell polyomavirus (**c**). The tumor cells show expression of PD-L1 (1–5%) (**d**) and NGF expression (> 50%) (**e**), and are positive

for tropomyosin receptor kinase A with weak cytoplasmic expression and strongly positive perinuclear dots (**f**). P75NTR in a case with positivity in more than 5% of tumor cells (**g**). Original magnification ×200 in **a**, ×400 in **b–g**

Table 2 Histopathological characteristics of Merkel cell carcinoma ($n = 39$)

Marker	CK20	Synaptophysin	MCPyV	NGF	PD-L1	PD-1	TrkA			
Cell type	Tumor	Tumor	Tumor	TAIC	Tumor	TAIC	Tumor	TIL	Tumor	Tumor
Expression	100%	100%	84%	70.6%	23.5%	95%	43%	66%	6%	100%
<i>n</i> (evaluable) ^a	38	38	38	34	37		35			36

MCC Merkel cell carcinoma, CK20 cytokeratin 20, MCPyV Merkel cell polyomavirus, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed-death ligand 1, NGF nerve growth factor, TrkA tropomyosin receptor kinase A, TIL tumor infiltrating lymphocyte, TAIC tumor-associated interdigitating cell

^aIn some cases, the stainings were not evaluable, even though repetition of staining had been performed. If so, we considered the case as ‘not evaluable’, which decreased the total number of evaluable stainings

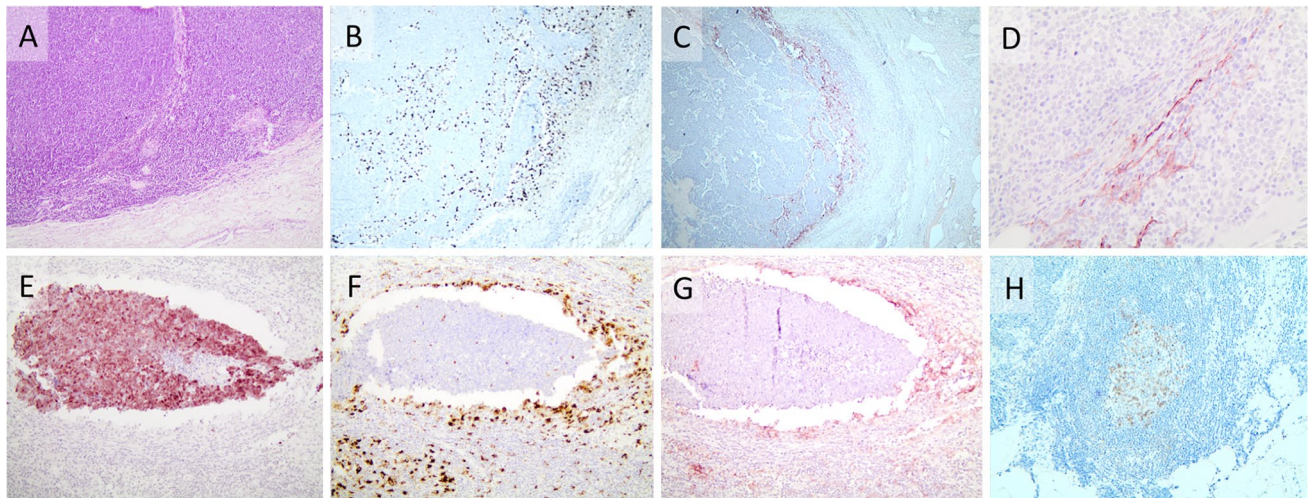


Fig. 2 Merkel cell carcinoma and its surrounding microenvironment (**a**, H&E). CD68-positive cells are distributed in the area of contact between the tumor cell complexes and surrounding tissue and less pronounced in the inner parts of the tumor (**b**). In the same areas, NGF is expressed on cells with spindle cell morphology (**c**, **d**). Merkel cell polyomavirus positive tumor cell complexes (**e**) are

surrounded by CD68-positive spindle cells display a rimming phenomenon (**f**), and the CD68-positive cells show also PD-L1 expression (**g**). Lymphocytes in close proximity to the tumor are positive for PD-1 (**h**). Original magnification $\times 40$ in **c**; $\times 100$ in **a**; $\times 200$ in **b**, **e**–**h**; $\times 400$ in **d**

interface or in septae reaching between tumor areas. Interestingly, also the tumor cells with PD-L1 expression were mainly localized in these areas. Lymphocytes did not show expression of PD-L1.

PD-1

In most cases, PD-1 was found in lymphocytic cells (66%; 23/35), which were localized at the tumor/stroma interface or in the septae representing tumor infiltrating lymphocytes (TILs) (Fig. 2). The expression of PD-1 in all these cases was low ($< 5\%$). As the amount of PD-1+ TILs was mainly restricted to single cells, a detailed quantitative analysis was not done. In two cases (6%, 2/35), PD-1 was detected on tumor cells; in both cases, the expression was $< 5\%$. PD-1 expression was not observed in CD68+ spindle cells.

P75NTR

In 67% (24/36), P75NTR was also expressed on the CD68+ spindle cells (Fig. 2). The tumor cells showed a relevant expression ($> 50\%$ of the tumor cells) in 6% (2/36). In 8% (3/36), an expression in 25–50% of the tumor cells was seen and another 6% (2/36) displayed a scattered positivity (10–25% of the tumor cells) only (Fig. 1). The expression of p75NTR was not detected in lymphocytic cells.

Inflammatory infiltrate

The density of the tumor surrounding and infiltrating inflammatory infiltrate was low in 43.6% (17/39), moderate in 41.0% (16/39), and dense in 15.4% (6/39) cases.

Correlation analyses

The expression of PD-1, PD-L1, TrkA, and NGF was correlated with the MCPyV status. Immunostaining for MCPyV correlated with PD-L1 expression ($p = 0.023$). However, the significance was lost after correction for multiple testing.

Subgroup comparison

Subsequently, we performed a comparative analysis for both PD-1 (on lymphocytes) and NGF (on spindle cells) expressing versus non-expressing subgroups to exclude confounding errors for the survival analysis (Table 1). No statistical significant differences could be detected (cutoff applied: $p < 0.05$). In summary, our evaluation revealed comparable distribution of the patients within the groups.

Survival analysis

The overall and disease-specific survival was assessed in relation to the PD-1 (on lymphocytes), PD-L1 ($\geq 1\%$ on tumor cells) and NGF (on spindle cells) status (Fig. 3).

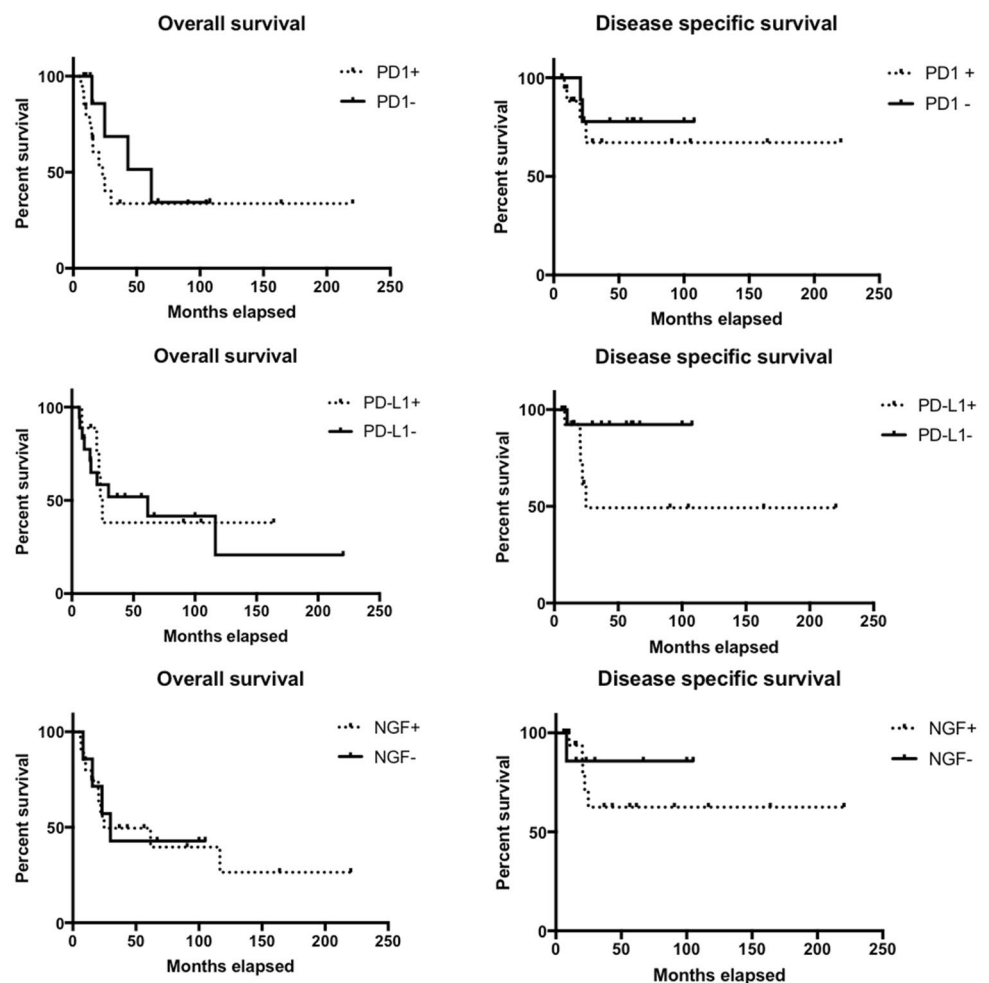
Statistical significance could not be shown for any of the comparisons. The reported values can be considered as tendencies for the different expression profiles. The Kaplan–Meier curves for overall survival comparing PD-1+ to PD-1– patients revealed a shorter median survival time for PD-1+ patients (23.2 months versus 61.6 months, $p=0.35$). With regard to disease-specific survival, 67% of the PD-1+ patients and 78% of PD-1– patients were still alive after 30 months ($p=0.54$). The median survival time was not reached. For PD-L1 expression ($\geq 1\%$ on tumor cells), the median overall survival was shorter for PD-L1+ patients (PD-L1+ 24.7 versus PD-L1– 61.6 months, $p=0.86$). After 30 months, 92% of the PD-L1– patients compared to 49% of PD-L1+ patients were alive in the disease-specific survival analysis ($p=0.059$). In addition, NGF expression was correlated with worse outcome. The median overall survival for NGF+ patients versus NGF– was 24.7 and 29.8 months, respectively ($p=0.88$). The disease-specific survival after 30 months was 62.5% in the NGF+ group versus 85.7% in the NGF– group ($p=0.48$).

Discussion

In view of the limited number of treatment options for MCC patients, there is an urgent need for the discovery of tumor-specific pathways and possible therapeutic targets (Coit 2001; Lemos et al. 2010). It has been shown that virus-driven human cancers have developed immune escape strategies, and therapeutic intervention of immune checkpoint pathways has gained considerable interest in MCC (Schandorf et al. 2017). Recently, we described a TrkA expression on tumor cells of MCC, and thus, the potential ligands and interaction with the tumor microenvironment became of interest (Wehkamp et al. 2017).

In this study, we explored the expression of NGF, PD-1, and PD-L1, which have been shown to be involved in immune evasion strategies of malignant tumors (Boger et al. 2016). For the first time, we describe here the expression of NGF on cells in the microenvironment of MCC. NGF is a neuropeptide with a vast spectrum of assigned functions, also in the context of cancer: (1) stimulation of cell proliferation and survival, (2) receptor growth-inhibitory effects,

Fig. 3 Merkel cell carcinoma Kaplan–Meier curves for overall and disease-specific survival in correlation with the PD-1 expression on lymphocytes and in correlation with the NGF expression on CD68+ spindle cells, respectively. No statistical significant findings due to low patient numbers (p values in the text). Tendencies for PD-1: shorter median overall survival time for PD-1+ patients (PD-1+ 23.7 months versus PD-1– 61.6 months). Lower percentage of surviving patients in the disease-specific survival calculations after 30 months, when PD-1+ (PD-1+ 67% versus PD-1– 78%). Tendencies for NGF: shorter median overall survival for NGF+ patients (NGF+ 24.7 months versus NGF– 29.8 months). Lower percentage of surviving patients in the disease-specific survival calculations after 30 months, when NGF+ (NGF+ 62.5% versus NGF– 85.7%)



(3) regulation of immune functions (Lambiase et al. 1997; Levi-Montalcini 1987; Meffert et al. 2003; Zhu et al. 2001). We detected NGF mainly on PD-L1+ CD68+ spindle cells in the microenvironment. These cells are also called tumor-associated immune cells (TAIC) because of their presence in the tumor microenvironment and their potential immunological effects (Lipson et al. 2013). The term TAIC is used synonymously with interdigitating dendritic cells. Most likely, the CD68+ spindle cells detected in our analysis are interdigitating dendritic cells, which are part of the antigen-presenting system and belong to the most potent stimulators for naive T-lymphocytes (Banchereau and Steinman 1998). Whether this effect is correlated to PD1/PD-L1 expression is still unknown.

However, in most cases of our MCC cohort, the expression of PD-L1 was found in a low amount on tumor cells and interestingly also on the CD68+ spindle cells in close proximity to the tumor. A recent study reported that these CD68+ spindle cells also express CD33, which indicates the derivation of myeloid dendritic cells and corroborates the belief that these cells are, indeed, interdigitating dendritic cells. The study also showed that PD-L1 is expressed on the tumor cells that are localized at the edge of the tumor with contact to the microenvironment (Mitteldorf et al. 2017). We observed the same phenomenon in our analysis. Anyway, the expression of PD-L1 on the TAIC in comparison to the tumor cells seemed in many cases more pronounced. Our finding of distinct PD-L1+/CD68+/NGF+ immune cells in the microenvironment is detectable in a high percentage of cases and seems to represent a specific detail. For MCC, the PD-L1 expression on cells in microenvironment has been observed and described by one other group. In their cohort of 49 patients, the expression of PD-L1 in TILs and tumor cells in approximately 50% each is described. In addition, the presence of CD68+ macrophages was mentioned, however, without correlation to PD-L1 expression (Lipson et al. 2013). The concept in most cancers describes the expression of PD-L1 on tumor cells leading to a direct T-cell inhibition. Whether this mechanism in MCC differs or has an additional component because of its pronounced expression of PD-L1 on CD68+ spindle cells and not only on the tumor cells, which has to be shown in further studies. In patients with non-small cell lung cancer, the same phenomenon of TAIC with PD-L1 expression has been observed, similar to our findings of PD-L1 expression in MCC (Parra et al. 2016).

As NGF is expressed on the PD-L1+ CD68+ spindle cells and TrkA is present on tumor cells, an interaction is likely and could link the TAIC and the tumor cell. The TILs revealed PD-1 expression. Considering that TAIC represent the major part of cells with PD-L1 positivity in MCC, the interaction between the tumor cell and the lymphocyte seems unclear. It might be possible that the TAIC acts as intermediary between tumor and lymphocytic system. P75NTR, the low-affinity

receptor for NGF, was detected in most cases of our cohort on the TAIC and in a few cases also on the tumor cells. One of the main functions of p75NTR is the induction of apoptosis (Kenchappa et al. 2010). The restricted expression of p75NTR in addition to the high expression of TrkA on the tumor cells might be a specific feature of a proliferating malignant cell population resisting pro-apoptotic signaling.

With regard to patient survival, we were unable to yield statistically significant data probably due to low patient numbers and due to the chosen cutoffs for the immunohistochemical parameters, respectively. However, the expression of PD-1, PD-L1, and NGF seemed to be associated with worse patient outcome supporting the tumor biological significance of their expression in MCC. The study of larger patient series is desirable, albeit MCC is a rare tumor and our cohort is among the larger ones (Lipson et al. 2013; Narisawa et al. 2015; Van Gele et al. 2001; Xie et al. 2014).

In summary, our study supports the contention that the microenvironment of MCCs possesses specific characteristics with an inflammatory infiltrate rimming around the tumor. In addition, we could show, for the first time, that NGF is expressed on the PD-L1+ CD68+ cells in the microenvironment. With regard to the known TrkA expression on the tumor cells, this finding might be important for the understanding of the interaction of MCC with its microenvironment and might provide the basis for the development of novel therapeutic strategies for the treatment of MCCs.

Acknowledgements The authors thank Hans-Michael Behrens and Thomas Langkamp for advice regarding statistical calculations and Arne Voss for help in image editing.

Funding None.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S (2016) NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 1:e000023. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2015-000023>
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>

- Bichakjian CK et al (2014) Merkel cell carcinoma, version 1.2014. J Natl Compr Cancer Net JNCCN 12:410–424
- Boger C, Behrens HM, Mathiak M, Kruger S, Kalthoff H, Rocken C (2016) PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of western patients. Oncotarget 7:24269–24283. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8169>
- Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H (2015) NGF and ProNGF: regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. Adv Biol Regul 58:16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.11.003>
- Coit DG (2001) Merkel cell carcinoma. Ann Surg Oncol 8:99S–102S
- Drilon A et al. (2017) A next-generation TRK kinase inhibitor overcomes acquired resistance to prior TRK kinase inhibition in patients with TRK fusion-positive solid tumors. Cancer Discov. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0507>
- Freidin MM (2001) Antibody to the extracellular domain of the low affinity NGF receptor stimulates p75(NGFR)-mediated apoptosis in cultured sympathetic neurons. J Neurosci Res 64:331–340
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. Science 252:554–558
- Kaufman HL et al (2016) Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 17:1374–1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30364-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30364-3)
- Kenchappa RS, Tep C, Korade Z, Urrea S, Bronfman FC, Yoon SO, Carter BD (2010) p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme/ADAM17. J Biol Chem 285:20358–20368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082834>
- Kluger HM et al (2015) Characterization of PD-L1 expression and associated T-cell infiltrates in metastatic melanoma samples from variable anatomic sites. Clin Cancer Res 21:3052–3060. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3073>
- Kostine M, Cleven AH, de Miranda NF, Italiano A, Cleton-Jansen AM, Bovee JV (2016) Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. Modern Pathol <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.108>
- Lambiase A et al (1997) Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. J Allergy Clin Immunol 100:408–414
- Lemos BD et al (2010) Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. J Am Acad Dermatol 63:751–761. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.02.056>
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. Science 237:1154–1162
- Lipson EJ et al (2013) PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. Cancer Immunol Res 1:54–63. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0034>
- Marlin MC, Li G (2015) Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome. Int Rev cell Mol Biol 314:239–257. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2014.10.002>
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D (2003) NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. Nat Neurosci 6:1072–1078. <https://doi.org/10.1038/nn1110>
- Miller RW, Rabkin CS (1999) Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. Cancer Epidemiol Biomark 8:153–158
- Mitteldorf C, Berisha A, Tronnier M, Pfaltz MC, Kempf W (2017) PD-1 and PD-L1 in neoplastic cells and the tumor microenvironment of Merkel cell carcinoma. J Cutan Pathol 44:740–746. <https://doi.org/10.1111/cup.12973>
- Narisawa Y, Koba S, Inoue T, Nagase K (2015) Histogenesis of pure and combined Merkel cell carcinomas: an immunohistochemical study of 14 cases. J Dermatol. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12808>
- Parra ER et al. (2016) Image analysis-based assessment of PD-L1 and tumor-associated immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non-small cell lung carcinoma patients. Clin Cancer Res. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2443>
- Patnaik A et al (2015) Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 21:4286–4293. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2607>
- Riley JL (2009) PD-1 signaling in primary T cells. Immunol Rev 229:114–125. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x>
- Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G, Hamamoto T, Miyazaki K (2001) Combined evaluation of NGF and p75NGFR expression is a biomarker for predicting prognosis in human invasive ductal breast carcinoma. Oncol Rep 8:973–980
- Santos-Juanes J et al (2015) Merkel cell carcinoma and Merkel cell polyomavirus: a systematic review and meta-analysis. Br J Dermatol 173:42–49. <https://doi.org/10.1111/bjd.13870>
- Schadendorf D et al (2017) Immune evasion mechanisms and immune checkpoint inhibition in advanced merkel. Cell Carcinoma Oncoimmunol 6:e1338237. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1338237>
- Van Gele M, Leonard JH, Van Roy N, Cook AL, De Paepe A, Speleman F (2001) Frequent allelic loss at 10q23 but low incidence of PTEN mutations in Merkel cell carcinoma. Int J Cancer Journal international du cancer 92:409–413
- Wehkamp U, Stern S, Kruger S, Hauschild A, Rocken C, Egberts F (2017) Tropomyosin receptor kinase A expression on merkel cell carcinoma cells. JAMA Dermatol. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2017.2495>
- Xie H et al (2014) TERT promoter mutations and gene amplification: Promoting TERT expression in Merkel. Cell Carcinoma Oncotarget 5:10048–10057
- Zhu ZW, Friess H, Wang L, Bogardus T, Korc M, Kleeff J, Buchler MW (2001) Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res 7:105–112