

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

**Das Immunprofil des humanen Adenokarzinom des Ösophagus
Vergleich von therapienaiven und neoadjuvant vorbehandelten Tumoren**

Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von Maximilian Schömmel
aus Freiburg im Breisgau

promoviert am 05. Februar 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. A. Quaas

2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. L. M. Schiffmann

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Univ.-Professor Dr. med. Alexander Quaas

Herr Professor Dr. med. Florian Gebauer

Frau Dr. Svenja Wagener-Ryczek

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Dr. Svenja Wagener-Ryczek und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Wiebke Jeske durchgeführt worden.

Die Auswertung der gesammelten Daten wurde zusammen mit Herrn Professor Dr. med. Florian Gebauer und Frau Dr. Svenja-Wagener-Ryczek durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 5.12.2023

Unterschrift: 
(Maximilian Schömmel)

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Alexander Quaas und seinem unermüdlichen und immer freundlich-motivierenden Nachrichten aller Art möchte ich danken, ohne ihn wäre all das nicht möglich geworden.

Frau Dr. Svenja Wagener-Ryczek und ihren Erklärungen, Beratungen und Hilfe, sowie lustigen Labor-Anekdoten über andere Doktorand*innen muss ebenfalls gedankt werden.

Widmung
Meinen Eltern und Stefan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Zusammenfassung.....	10
2. Einleitung	13
2.1 Epidemiologie des Ösophagus-Karzinoms.....	13
2.2 Ätiologie des Ösophagus-Karzinoms.....	14
2.3 Klassifikation des Ösophagus-Karzinoms	15
2.4 Therapie des Ösophagus-Karzinoms	16
2.4.1. Endoskopische Resektion.....	16
2.4.2. Chirurgische Therapie.....	17
2.4.3. Neoadjuvante (Radio)chemotherapie	17
2.5 Tumorimmunologie.....	18
2.5.1. Grundlagen	18
2.5.2. T-Zell vermittelte Immunantwort.....	19
2.5.3. Tumor Escape Mechanismen	20
2.5.4. Immun-Checkpoints	21
2.5.5. Immun Checkpoint Inhibitoren	22
2.6 Zielsetzung der Arbeit	23
3. Publikationen	26
3.1 Distribution of tumor-infiltrating-T-lymphocytes and possible tumor-escape mechanisms avoiding immune cell attack in locally advanced adenocarcinomas of the esophagus.....	26
3.2 Immune profile and immunosurveillance in treatment-naive and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma	37
4. Diskussion.....	49
4.1 T-Zell Status	51
4.2 Expression verschiedener Immuncheckpoints	56
4.3 Die „Tumor inflammation signature“	60
4.4 Der Einfluss von neoadjuvanter (Radio)chemotherapie auf das Immunprofil	61
4.5 Mögliche neue therapeutische Ansätze für EACs.....	64
5. Literaturverzeichnis	66
6. Anhang.....	74

6.1	Abbildungsverzeichnis.....	74
-----	----------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR: 5-Jahres Überlebensrate

AEG: Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AKT: Proteinkinase B

APC: Argon-Plasma-Coagulation

ARG1 : Arginase 1

ATR: Ataxia teleangiectasia and Rad3 related

BE: Barrett-Esophagus

BER: Base Excision Repair

CCR3: chemokine receptor type 3

CD: cluster of differentiation

CIS: Carcinoma in situ

CSM: consensus molecular subtype

CTA: cancer testis antigen

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL9: Chemokine (C-X-C motif) ligand 9

DCs: Dendritic cells

DDR: DNA Damage Response

DNAse: deoxyribonuclease

EAC: Esophageal Adenocarcinoma

EBV: Epstein-Barr-Virus

EMR: Endoskopische Mukosaresektion

ESCC: Esophageal Squamous Cell Carcinoma

ESD: Endoskopische Submukosadisektion

EUS: Endoskopische Ultraschalluntersuchung

EZH2: Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

FC: fold change

FFPE: formalin-fixed and paraffin embedded
FNP: Feinnadelpunktion
GCL: Glutamate-Cysteine Ligase
GCLC: Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit
GCLM: Glutamate-Cysteine-Ligase Modifier Subunit
GERD: Gastroesophageal Reflux Disease
GSH: Glutathion
H&E: hematoxylin-eosin
HAVCR2: Hepatitis A virus cellular receptor 2
HER2: human epidermal growth factor receptor 2
HGIEN: High-grade intraepitheliale Neoplasie
HLA: human histocompatibility leukocyte Ag
HPV: Humanes Papillomavirus
HR: Homologe Rekombination
IDO: Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IEN: Intraepitheliale Neoplasie
IFN- γ : interferon-gamma
LAG3: Lymphocyte-activation gene 3
LGIEN: Low-grade intraepitheliale Neoplasie
LILRB1: Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1
LOH: Loss of Heterozygosity
mAb: monoclonal Antibody
MDCT: Multidetektor-Computertomographie
MHC: major histocompatibility complex
MMR: Mismatch-Repair
mRNA: micro ribonucleic acid
MSI: microsatellite instability
NACT: neoadjuvant chemotherapy

NCCN: National Comprehensive Cancer Network
NER: Nucleotide Excision Repair
NSCLC: non-small-cell lung carcinoma
OS: overall survival
PARP: Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PD-1: programmed death 1 receptor
PD-L1: programmed death ligand 1
PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase
PRC: Polycomb Repressive Complex
RCT: radio chemotherapy
RNA: ribonucleid acid
ROS: Reactive oxygen species
TGF: transforming growth factor
TIL: tumor infiltrating lymphocyte
TIM3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TIS: tumor inflammation signature
TMA: Tissue microarray
TMB: tumor mutation burden
TNF tumor necrosis factor
UICC: Union international contre le cancer
WGS: Whole-Genome-Sequencing

1. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) hat mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 20 % nach wie vor eine ungünstige Prognose. Seine Inzidenz steigt in den westlichen Industrienationen weiter an. Therapierelevante Subgruppen oder personalisierte Therapieoptionen fehlen bislang weitgehend.

Bisher ist sehr wenig über die Komposition des lokalen inflammatorischen Mikroenvironments des EAC und potentielle immunologische Tumor-Escape Mechanismen bekannt.

Ziel meiner beiden Publikationen, die dieser Dissertationsschrift zu Grunde liegen, war es, die Zusammensetzung und Relevanz des inflammatorischen Mikroenvironments unter unterschiedlichen klinisch relevanten Bedingungen zu beschreiben: a) die Auswirkung der neoadjuvanten (Radio-)Chemotherapie auf die Immunprofilzusammensetzung, b) Inflammationsumfang und Inflammationszellverteilung im Tumorgewebe und Prognose bei therapienaiven Tumoren und c) Versuch, neue therapeutischen Ansatzpunkte zu finden.

In der Publikation „Immune profile and immunosurveillance in treatment-naive and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma“ habe ich mittels der NanoString Technologie die Expression von 770 Genen untersucht, die eine wichtige Rolle bei malignen Tumoren und ihrem inflammatorischen Mikromilieu spielen. Verglichen wurden die Expressionsunterschiede zwischen normalem Ösophagus – primär operierten Adenokarzinom und unterschiedlich neoadjuvant behandeltem Tumorgewebe.

Im Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe findet sich eine deutliche Expressionssteigerung multipler Immuncheckpointmarker wie LAG3 (4-fach), TIM-3 (3-fach), CTLA4 (3,5- bis 4-fach) und CD276 (B7-H3) (2,5-fach).

Des Weiteren konnte eine 2,5- bis 3-fache Expressionserhöhung von CD38 und LILRB1 im Vergleich von Tumor- und Normalgewebe gefunden werden. Dies stellt nicht nur einen möglichen Tumor Escape Mechanismus dar, sondern konnte

therapeutisch interessant sein, da bereits ein anti-CD38 Antikörper „Daratumumab“ existiert.

Die derzeit therapierelevante PD-L1 Expression zeigte jedoch nur eine minimale Expressionssteigerung, während die PD-1 Expression bis zu 3-fach erhöht vorlag. Es zeigte sich für PD-L1/PD-1 kein Expressionsunterschied zwischen primär resezierten und vorbehandelten Tumoren, das heißt die neoadjuvante Therapie hat die lokale Zusammensetzung von PD-L1/PD-1 nicht relevant beeinflusst.

Während für die Expression von TIM-3 wie beim PD-L1/PD-1 kein signifikanter Unterschied nach neoadjuvanter (Radio)chemotherapie nachgewiesen werden konnte, zeigte sich die LAG3 Expression um einen Faktor von zwei reduziert.

Die Immuncheckpointmarker zeigen sich also teilweise in ihrer Expression durch neoadjuvante Chemotherapie beeinflusst, in meiner Studie zeigten sich im Vergleich zwischen primär reseziertem versus neoadjuvant vorbehandeltem Gewebe jedoch keine, der zuvor genannten Gene unter den 50, deren Expression am meisten durch neoadjuvante Chemotherapie verändert wurde.

Beim Vergleich der beiden gängigen neoadjuvanten Therapieschemata CROSS (Radio-Chemotherapie) versus FLOT (Chemotherapie) konnte Expressionsunterschiede in Genen der Antigenprozessierung des MHC II-Komplexes sowie der B-Zell Aktivierung (CD79A, CD79B, CD19 und CD21) in der FLOT-therapierten Tumoren aufgedeckt werden. Im Gegensatz hierzu zeigten die CROSS-behandelten Tumore eine Expressionssteigerung in Genen der Antigenprozessierung des MHC I-Komplexes und assoziierter Transporter Gene TAP1 und TAP2.

Zusammengefasst findet sich ein sehr heterogenes Expressionsprofil in Abhängigkeit des betrachteten Checkpointmarkers und neoadjuvanter Therapieregime. Unsere Hypothese, dass eine neoadjuvante Therapie zu einer globalen Beeinflussung der Expressionszusammensetzung aller lokalen Immuncheckpointmarker führt hat sich nicht bestätigt sondern ist differenzierter zu betrachten. Inwieweit CD38 therapeutisch genutzt werden kann müssen zukünftige Studien zeigen.

In der zweiten Publikation „Distribution of tumor-infiltrating-T-lymphocytes and possible tumor-escape mechanisms avoiding immune cell attack in locally advanced adenocarcinomas of the esophagus“ habe ich in einer software-gestützten Analyse die lokale T-Zellzusammensetzung bei lokal fortgeschrittenen (ab pT2), nicht neoadjuvant vorbehandelter EACs beschrieben. Hierbei wurde nach immunhistochemischer Färbung der CD3- und CD8-positiven T-Zellen ihre Absolutzahl sowie die Infiltrationsdichte ermittelt. Zudem wurde die T-Zellinfiltration des Tumorzentrums und der Invasionszone getrennt berücksichtigt sowie die Infiltrationszone noch einmal unterteilt in eine 50 µm dicke innere und 300 µm dicke äußere Infiltrationszone.

Entsprechend des von Galon et.al. für Adenokarzinome des Kolons vorgeschlagenen Immunoscores, der Anhand der T-Zellinfiltration des Tumorzentrums und der Invasionszone prognostische Aussagen erlaubt, habe ich in meinem EAC-Kollektiv eine Korrelation zwischen T-Zellinfiltration und Gesamtüberleben untersucht. Während mehrere gleichartige Analysen beim EAC bereits existieren, ist dies die erste Arbeit gewesen, die standardisiert an Tumorgroßflächen bei lokal fortgeschrittenen Tumoren diesen prognostischen Zusammenhang betrachtet hat.

Auch für das EAC konnte ich eine günstige prognostische Relevanz der T-Zellinfiltration des Tumorzentrums für das Gesamtüberleben zeigen. Jedoch konnte im Gegensatz zu den Studien an Adenokarzinomen des Kolons eine prognostische Relevanz der Invasionszone nicht nachgewiesen werden. Da auch endoskopisch-bioptisch gewonnene Proben das Tumorzentrum mit einbeziehen, könnte hierdurch eine potentielle Aussage über die Prognose von EACs anhand der T-Zellinfiltration getätigt werden. Dies wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weitere prospektive klinische Studien.

2. Einleitung

Das Adenokarzinom des Ösophagus gehört zu den Krebsarten mit den höchsten Mortalitätsraten. Trotz in den letzten Jahren verbesserter Therapieoptionen, leben fünf Jahre nach Diagnosestellung nur noch circa 20 % der Patienten. ¹

Gründe hierfür sind unter anderem die bei Diagnosestellung meist fortgeschrittene Krankheit durch ein langes symptomarmes Intervall, sowie die daraus resultierenden meist unzureichenden Möglichkeiten kurativer Therapieansätze.

In den Industrienationen Europas, Nord-Amerikas und Australien ist die Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus zusätzlich in den vergangenen 30ig Jahren deutlich gestiegen, so dass sie in diesen Ländern zum Teil inzwischen höher liegt als die des Ösophagus-Plattenepithelkarzinoms. ^{2,3}

Der kurative Therapieansatz beschränkt sich – wie bei allen soliden Tumoren – auf eine chirurgische en-bloc Resektion des Tumors mit neoadjuvanter oder post-operativer (Radio)-chemotherapie, nur Tumore im Frühstadium T1 können unter kurativer Absicht endoskopisch abgetragen werden. ⁴

Es besteht großer Bedarf bei der Erforschung neuer und individualisierter Therapieoptionen. Ein vielversprechender Ansatz könnte über ein signifikant verbessertes Verständnis der Zusammensetzung des inflammatorischen Mikromileus liegen. ⁵

2.1 Epidemiologie des Ösophagus-Karzinoms

Im Jahr 2017 erkrankten in Deutschland 5436 Männer und 1587 Frauen an einem Karzinom des Ösophagus, während die Anzahl an der Erkrankung Verstorbenen mit 4266 bzw. 1233 für die jeweiligen Geschlechter betrug. Damit entfielen etwa 3% aller Todesfälle durch Krebs bei Männern, sowie 1 % bei Frauen auf Krebserkrankungen des Ösophagus. ⁶

Das mittlere Erkrankungsalter lag mit 71 Jahren bei Frauen leicht über dem Erkrankungsalter für Männer mit 67 Jahren, die Fünf-Jahres-Überlebensrate jedoch mit circa 21 % war jedoch für beide Geschlechter gleich. ⁷

Weltweit zeigt sich aufgrund des demographischen Wandels eine steigende Tendenz für die Fallzahl an Ösophagus-Karzinomen ungeachtet des histologischen Typs. ⁸ Jedoch zeigt die Inzidenz der unterschiedlichen histologischen Subtypen Plattenepithel- und Adeno-Karzinom deutliche geographische Unterschiede. ^{2,3,9}

Bis vor 30 Jahren konnten weltweit nur in Einzelfällen Adeno-Karzinome gefunden werden, während die große Mehrheit mit über 90 % Plattenepithel-Karzinome waren. Jedoch zeigt sich seitdem vor allem in den Industrienationen Europas, Nord-Amerikas und Australien eine deutliche Zunahme von Tumoren des Adeno-Typs, sodass dieser den Plattenepithel-Typ in den Vereinigten Staaten von Amerika und Teilen Europas bereits als größte Entität der Ösophagus-Tumore abgelöst hat und diese Tendenz weiter ansteigt. ¹⁰

2.2 Ätiologie des Ösophagus-Karzinoms

Als Risikofaktoren des Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus gelten vor allem die Noxen Tabakrauch und Alkohol, die vor allem in langjähriger Kombination zu malignen Entartungen des physiologischen vorhandenen mehrfach unverhornten Plattenepithels führen. Die Tumore entstehen meist im Bereich der drei Engstellen der Speiseröhre, sodass im Gegensatz zu Tumoren des distalen Ösophagus, Neubildung im proximalen Bereich eher zu den Plattenepithel-Karzinomen zählen. ¹¹

Für das ösophageale Adenoarzinom gilt vor allem die Chronisch Entzündliche Refluxkrankheit des Ösophagus mit der hieraus resultierenden Barrett-Metaplasie als Hauptrisikofaktor bei einem Teil der Patienten. Patienten mit einer Barrettmukosa zeigen ein bis zu 43fach erhöhtes Risiko diese Karzinomentität zu entwickeln ¹² , zudem werden weitere Risikofaktoren wie Adipositas und Tabakkonsum diskutiert. ¹³

Die Barrett-Metaplasie ist eine Reaktion des Epithels des ösophageal-gastralen Übergangs auf die chronische Reizung bei konstantem Reflux von Magensäure oder Gallesekreten. Hierbei wandelt sich das physiologische unverhornte Plattenepithel in einem ersten Schritt zu Zylinderepithel, wie es physiologisch in der Magenschleimhaut vorkommt um, gefolgt von einer Intestinalisierung des Epithels mit Ausbildung von reifen Becherzellen. Nach den Kriterien der deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie und entsprechenden US-amerikanischen Fachgesellschaften ist eine Barrettmukosa entsprechend als eine „intestinalisierte Schleimhaut mit Becherzellen“ definiert. Die Barrett-Metaplasie gilt als Präkanzerose, da etwa 90 % der diagnostizierten Adeno-Karzinome des Ösophagus aus einer nachgewiesenen Barrett-Metaplasie entwickeln ¹⁴. Der Umkehrschluss trifft aber nicht zu. Nur circa 2-3% der Patienten mit einer Barrettmucosa entwickeln ein Adenokarzinom. Wesentliche Risikofaktoren für die maligne Entartung der Barrettmucosa sind das männliche Geschlecht und die Adipositas.

2.3 Klassifikation des Ösophagus-Karzinoms

Die Stadien des Ösophagus-Karzinoms erfolgen anhand der TNM-Klassifikationen anhand des Ausbreitungsgrades des Primärtumors, Befall der dazugehörigen Lymphknoten sowie dem eventuellen Vorhandensein von Metastasen. Die Einteilung erfolgt durch Zuhilfenahme verschiedener diagnostischer Geräte wie Endosonographie unter Ösophagogastrroduodenoskopie (ÖGD), Computertomographie sowie eventuell Magnetresonanztomographie zum Bestimmen von Fernmetastasen. ¹⁵

Eine histologische Diagnosesicherung und die Festlegung der endgültigen Tumorausbreitung am Operationspräparat erfolgt in der Histopathologie.

Das Ösophaguskarzinom breitet sich zunächst lokal durch die Wandschichten des Ösophagus aus, anhand der Ausbreitung in die verschiedenen histologischen Schichten des Ösophagus wird das T-Stadium bestimmt. Findet der Tumor Anschluss an Lymphbahnen kommt es typischerweise schon frühzeitig zu einer Metastasierung in lokale Lymphknoten. Die Wahrscheinlichkeit von

Lymphknotenmetastasierung hängt auch von T-Stadium ab. Diese beträgt im Stadium T1b circa 20%, im Stadium 3 bereits bei circa 90%. ¹⁶ Durch Anzahl und Lage der betroffenen Lymphknoten wird das N-Stadium festgelegt.

Durch Anschluss an Blutgefäße kann es zum Entstehen von Fernmetastasen kommen, diese befinden sich bei Ösophagus-Karzinomen meist in Lunge und Leber und werden als M-Stadium festgehalten. ¹⁷

2.4 Therapie des Ösophagus-Karzinoms

Abhängig vom TNM-Stadium des Tumors sowie des Allgemeinzustandes und den Begleiterkrankungen des Patienten werden Therapien in kurativer und palliativer Absicht unterschieden. ¹⁵

Zu den kurativen Therapiemöglichkeiten gehören die endoskopische Resektion bei Frühstadien, die primäre chirurgische Resektion, die definitive Radiochemotherapie und (neo-)adjuvante Therapien. Zu den palliativen Therapiemöglichkeiten gehören systemische (Radio-)chemotherapien, zielgerichtete Therapien sowie lokale Therapien.

2.4.1. Endoskopische Resektion

Bei oberflächlichen Neoplasien kommt eine endoskopische Resektion in Frage. Hierzu wird in Deutschland vor allem die endoskopische Mukosaresektion (EMR) und die endoskopische Submukosaresektion (ESD) eingesetzt. ¹⁵ Da die genaue Infiltrationstiefe eine große Auswirkung auf Prognose und Therapie hat wird sie nach der Klassifikation der „Japan Esophageal Society“ speziell für Tumore des Stadiums pT1 subklassifiziert indem Mukosa und Submukosa in drei Drittel aufgeteilt werden sodass die Infiltrationstiefe genauer beachtet werden kann ^{16,18} Bei nicht vorhandener Venen- und Lymphgefäßinvasion, fehlende Ulzerationen und gut ausgeprägter Differenzierung (G1/2) stellt die endoskopische Resektion für mukosale Adenokarzinome (pT1a) die Therapieempfehlung dar.

Bei Adenokarzinomen welche bereits bis in das oberste Drittel der Submukosa (pT1b) eingedrungen sind sollten zudem die Kriterien Größe <20 mm und Eindringtiefe <500 µm erfüllt sein um eine endoskopische Resektion als Therapie zu empfehlen. Bei größeren Adenokarzinomen oder Eindringtiefe bis in das mittlere Drittel der Submukosa wird eine chirurgische Resektion empfohlen.¹⁵

2.4.2. Chirurgische Therapie

Die kurative chirurgische Therapie sieht die R0-Resektion des Tumorgewebes vor. Die transthorakale „en bloc“-Ösophagektomie mit Entfernung des Primärtumors sowie evtl. befallener Lymphknoten und Nachbarorgane und anschließendem Magenhochzug gilt als Operation der Wahl bei fortgeschrittenen Tumoren (ab T2)¹⁹. Die Rekonstruktion der Ösophageal-Gastralen Passage erfolgt bei gleichzeitiger Entnahme des Magenfundus im Rahmen von distalen Tumoren durch eine intrathorakale Anastomosenbildung unter Bildung eines sogenannten Schlauchmagens.

Ist eine spannungsfreie Anastomisierung nicht möglich ergibt sich die Möglichkeit eines Interponats aus Colon oder Jejunum.

2.4.3. Neoadjuvante (Radio)chemotherapie

Als radiochemotherapeutischer Ansatz steht der primären Operation eine Resektion mit vorhergehender neoadjuvanter RCTx mit kurativem Ansatz gegenüber. Eine Therapie mit RCTx ohne anschließende Ösophagektomie wird in den meisten Fällen nur palliativ verfolgt²⁰.

Die Ösophagektomie findet durchschnittlich nach einem Intervall von 4-8 (bis zu 12) Wochen nach erfolgter RCTx statt.²¹

Ungeachtet des histologischen Subtyps zeigt eine neoadjuvante Therapie ein verbessertes Gesamtüberleben und eine verbesserte Rate an R0-Resektionen.²²

Die beiden gängigen Verfahren sind die Radiochemotherapie nach CROSS-Schema und die alleinige Chemotherapie nach FLOT Schema. Eine alleinige Bestrahlung wird nicht empfohlen.

Zusätzlich zu der RTx wird meist eine zeitgleiche Chemotherapie (CTx) begonnen um die Effekte der beiden Therapieansätze miteinander zu kombinieren.

Verschiedene chemotherapeutische Schemata stehen hierbei zur Auswahl, wobei die sogenannte FLOT Kombination in Studien im Vergleich zur Kombination anderer Chemotherapeutika deutlich bessere Ergebnisse liefern konnte.²³ Hierbei werden die Medikamente 5-FU, Folinsäure, Oxaliplatin und Docetaxel miteinander kombiniert, wobei vor allem 5-FU und Oxaliplatin gleichzeitig die Radiosensibilität der Tumorzellen erhöhen sollen. 5-FU hemmt die DNA und RNA-Synthese, während Oxaliplatin zu einer Quervernetzung der DNA-Intrastränge führt (sogenanntes DNA cross-linking) welches ebenfalls zu einer verlangsamten Reparatur der DNA führt, werden die Tumorzellen nun unter RTx Strahlung ausgesetzt kann durch die zeitgleiche CTx ein synergistischer Effekt erzielt werden.^{24,25}

Neuerdings kommen sowohl im neoadjuvanten als auch im adjuvanten Setting Kombinationstherapien mit Checkpointinhibitoren, die gegen PD-1/PD-L1 gerichtet sind zum Einsatz (z.B. RICE-Study, Checkmate-Study 649).²⁶

2.5 Tumorimmunologie

2.5.1. Grundlagen

Die grundlegende Idee ist, dass das Immunsystem nicht nur zur Bekämpfung von Pathogenen sondern auch von körpereigenen entarteten Zellen, die mutierte Fremdproteine auf ihrer Zelloberfläche via MHC1 Komplexen dem Immunsystem präsentieren, hoch relevant ist. Entscheidend ist dabei das Verständnis darüber, wie es einem Tumor gelungen ist das Immunsystem zu umgehen, um zu einem klinisch

relevanten, erkennbaren Tumor zu „reifen“. Die individualisierten Immunescape-Mechanismen des Tumors müssen erkannt und eliminiert werden. Zu den Escapemechanismen gehören die a) Expression von lokal immunsupprimierend wirkenden Proteinen wie PD-L1, LAG3, TIM3, CTLA4 u.a. durch die Tumorzellen selbst oder auf Entzündungszellen im inflammatorischen Mikromileu des Tumors b) Reduktion der Antigenpräsentationsfähigkeit via MHC1 und Hilfsproteinen c) weiteren immunsupprimierenden Zellen wie M2-Makrophagen. Auf dem Boden von frühen Forschungen zum Thema der Tumorimmunologie ²⁷ hat sich der Begriff des Immunoediting als Bezeichnung der Reaktion des Immunsystems auf Tumorzellen durchgesetzt. Diese Reaktion wird in die drei Phasen Eliminierung (elimination), Gleichgewicht (equilibrium) und Entkommen (escape) unterteilt: ²⁸

1. Eliminierung: Durch Exprimieren von Tumorantigenen, werden entartete Zellen von den Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten) erkannt und zerstört. Dies wird auch als Immunosurveillance bezeichnet
2. Gleichgewichts: Falls in der Eliminationsphase nicht alle mutierten Zellen zerstört wurden, entstehen neue Tumorzellvarianten mit diversen Neumutationen. Bei weiterer Eliminierung kommt es so zur Selektion von Zellen mit geringerer Immunigenität, welche sich durch Mutationen dem Immunsystem entziehen können.
3. Entkommen: Die überlebenden Tumorzellen, welche nicht mehr durch das Immunsystem erkannt werden, können sich unkontrolliert vermehren und führen zur klinisch manifesten Tumorerkrankung.

2.5.2. T-Zell vermittelte Immunantwort

Ähnlich wie ein exogenes Pathogen können auch mutierte körpereigene Zellen vom adaptiven, spezifischen Immunsystem erkannt und zerstört werden. Tumorzellen bieten Merkmale welche sie von gesunden Körperzellen unterscheiden. Hierbei sind insbesondere die tumorassoziierten Antigene (TAA) hervorzuheben, welche aus der Dysregulierung oder Mutation von Wirtsgenen der gesunden Körperzelle entstehen.

Tumorassoziierte Antigene können in verschiedene Untergruppen unterteilt werden:
²⁹ 1.) Differenzierungsantigene, die für bestimmte Gewebe spezifisch sind und auch von Normalgewebe exprimiert werden können; 2.) Überexprimierte Antigene, welche durch vermehrte Genexpression oder Transkription gebildet werden z.B. HER-2/neu; 3.) Cancer-Testis-Antigene (CTAs) welche in gesunden Gewebe nur in den Keimzellen nachgewiesen werden kann aber auch von Tumorzellen gebildet werden z.B. die Proteine der MAGE-Familie; 4.) Tumorspezifische Mutationsgene welche in den meisten Fällen durch Punktmutationen entstehen z.B. bcr-abl oder TP53 und 5.) virale Antigene welche nur in virusinfizierten Zellen gebildet werden (z.B. EBV).

Das adaptive Immunsystem hat die Möglichkeit diese TAAs zu erkennen und einen gezielten Angriff durchzuführen. Sogenannte nicht erschöpfte CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten können durch MHC-I- Komplex vermittelte Präsentation von TAA eine potentielle Krebszelle frühzeitig eliminieren.

Im Rahmen ihrer Aktivierung entstehen tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) welche in den soliden Tumor migrieren und hier eine weitere lokale Immunreaktion erzeugen. Studien konnten in verschiedenen Tumorentitäten einen positiven Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von TILs und der Gesamtprognose nachweisen. ^{30,31}

2.5.3. Tumor Escape Mechanismen

Verschiedene Mechanismen tragen bei der Karzinogenese dazu bei dass eine entartete Zelle nicht mehr immunogen genug ist um vom körpereigenen Immunsystem erkannt zu werden. ³²

Bereits in der Frühphase der Tumorentwicklung beginnen Tumorzellen sich der Entdeckung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entziehen. Es kommt zu einem Verlust der Antigenität zum Beispiel durch Verlust der Antigenexpression oder Mutation des Antigens sowie Verlust von Bestandteilen der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie ^{33,34}. Hierdurch kommt es nach und nach zur Selektion von weniger

immunogenen Tumorzellen und zum Tumorwachstum. Des Weiteren wird durch ein immunsuppressives Mikroenvironment wie in den einleitenden Worten bereits geschildert der Tumorescape gefördert.³⁵

Ein weiterer Mechanismus besteht durch die Sekretion von immuninhibitorischen Zytokinen durch den Tumor und das begleitende Tumormikromillieu. Diese Zytokine sind unter anderem TNF-alpha, TGF-beta, IL6 und IL8 sowie Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF und fördern nicht nur Tumorwachstum sondern inhibieren auch T-Zell Aktivierung und Funktion und induzieren deren Apoptose.^{36,37}

2.5.4. Immun-Checkpoints

Zur weiteren Immunsuppression trägt auch die Überexpression inhibitorischer Liganden auf den T-Zellen im Tumorumfeld bei: diese werden allgemein als sogenannte Immun-Checkpoints oder Immun-Kontrollpunkte zusammengefasst.

Einer der bekanntesten Immun-Checkpoints ist der Rezeptor CTLA-4 (CD152) auf der Oberfläche von T-Zellen. In seiner physiologischen Reaktion wird er bei Aktivierung der T-Zelle auf der Oberfläche exprimiert, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern. Durch einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus im Tumorumfeld kommt es zu einer Überexpression des Rezeptors auf T-Zellen und damit zu einer Hemmung der Immunantwort.³⁸

Das Molekül PD-1 (Programmed Death 1) ist ein weiterer Rezeptor auf T-Zellen, der mit dem dazugehörigen Liganden PD-L1, der auch auf den Tumorzellen exprimiert werden kann interagiert und daraufhin die weitere Immunantwort hemmt. Diesen Mechanismen machen sich Tumorzellen zu Nutze indem sie den Liganden PD-L1 vermehrt exprimieren und sich so vor der Reaktion des Immunsystems schützen können.^{39,40}

Weitere bekannte inhibitorische Immun Checkpoints sind TIM-3, A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4, BTLA, IDO, KIR, LAG3, und VISTA.

2.5.5. Immun Checkpoint Inhibitoren

In den letzten Jahren ist die Rolle des Immunsystems bei der Entwicklung von Tumoren mehr und mehr in den Fokus der Krebsforschung geraten. Verschiedene Publikationen widmen sich unter anderem der Signifikanz der Immunantwort für die Progression des Tumors und damit weitergehend der Überlebenszeiten und Prognose von Patienten. Das Potential der Immunantwort als prognostisches Mittel konnte unter anderem in Kolonkarzinomen, Lungentumoren und malignen Melanomen nachgewiesen werden.

Medikamentöse Ansätze die sich hieraus ergeben sind Immun Checkpoint Inhibitoren.

Diese monoklonalen Antikörper erreichen durch Inhibition bekannter Immun Checkpoints eine Erhöhung der antitumorösen T-Zell-Reaktion, was zu einer Immunreaktion gegen die Tumorzellen führen kann.

Als Beispiel zeigen die Medikamente Pembrolizimab oder Nivolumab durch Inhibition des programmed death-1 (PD-1) Rezeptor ein besseres Outcome bei Patienten mit bestimmten soliden Tumoren wie den Malignem Melanom und dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom.^{41–43}

Für Ösophaguskarzinome befindet die Therapie mit Immun Checkpoint Inhibitoren zu diesem Zeitpunkt noch im Anfangsstadium.^{44,45} Studien zu sowohl Pembrolizumab als Erst- und Zweitlinientherapie bei bereits metastasierten Ösophaguskarzinomen, als auch Nivolumab als adjuvante Therapie befinden sich gerade in Phase III Evaluation.

^{46,47}

Es konnte erst vor kurzem in der „Checkmate Study 649“ die Effektivität von Nivolumab für Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus, Magens und gastroösophagealen Übergangs nachgewiesen werden nachweisen. Patienten, welche mit Nivolumab und Chemotherapie nach FLOT-Schema behandelt wurden, zeigten im Gegensatz zu der Patientenkohorte, welche ausschließlich mit Chemotherapeutika behandelt wurde, ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben.

Hiermit könnte Nivolumab in Kombination mit klassischer Chemotherapie eine neue first-line Standardtherapie für diese Tumorentität bilden.²⁶

2.6. Zielsetzung der Arbeit

Da bisher sehr wenig über die genaue Beschaffenheit des Immunkompartiments von Adenokarzinomen des Ösophagus bekannt ist und sich durch das weitere Erforschen seiner genauen Zusammensetzung sowie der Expression von zugehörigen Genen möglicherweise neue und prognoseverbessernde Therapieverfahren erschließen lassen, wurde sich in dem eingereichten Paper *„Immune profile and immunosurveillance in treatment-naïve and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma“* mittels NanoString Technologie ein RNA-basiertes Expressionsprofil von sowohl primär resezierten als auch neoadjuvant vorbehandelten EACs erstellt.

Da der Großteil der EACs neoadjuvant vorbehandelt wird (in Köln als größtes europäischen Zentrum der operativen Behandlung des Ösophaguskarzinoms werden circa 90% der Ösophaguskarzinome neoadjuvant behandelt) stellt sich die Frage welche Auswirkungen dies auf das lokale immunologische Mikromillieu des Tumors hat.

Die Studie setzte sich zum Ziel das Immunprofil von primär reseziertem und neoadjuvant vorbehandelten EACs zu vergleichen und mögliche Ansatzpunkte für Immuntherapien zu finden.

Bestimmte Cancer Testis Antigene sind sowohl für die Tumorgenese als auch den Tumorprogress wichtig und könnten als mögliche therapeutische Ansatzpunkte dienen.

Zudem wurden die primär resezierten EACs in ihrer Regulation bestimmter Gene verglichen, welche mit einer Antwort auf PD-1 und PD-L1 Inhibitoren assoziiert werden.

Ein besonderes Augenmerk wurde vor allem auf eine Gruppe von 18 Genen des sogenannten „hot inflammation“ Profils gelegt, welche mit der T-Zell und IFN-γ

vermittelten Antwort auf Antigen-Präsentation, der Expression von Chemokinen, Zytotoxischer Aktivität sowie der adaptiven Immunresistenz assoziiert sind.

In einem zweiten Paper („*Distribution of tumor-infiltrating-T-lymphocytes and possible tumor-escape mechanisms avoiding immune cell attack in locally advanced adenocarcinomas of the esophagus. Clin Transl Oncol (2021).*“), wurde an einer größeren Kohorte primär resezierter lokal fortgeschrittener ($\geq$ pT2) EACs ein möglicher Zusammenhang zwischen der Infiltration von T-Zellen in den Tumor und ihrer exakten Lage im Tumor und der Prognoserelevanz untersucht.

Hierbei wurden Paraffinschnitte der besagten Tumore mittels der T-Zellmarker CD3 und CD8 gefärbt und digital gescannt. Mithilfe einer Computersoftware konnten die infiltrierenden T-Zellen ermittelt werden, wobei hier die T-Zellinfiltration im Tumorzentrum sowie in einer zuvor definierten Invasionszone von 350 μ m an der Begrenzung des soliden Tumors jeweils einzeln gemessen und auf ihre prognostische Relevanz untersucht wurden.

Des Weiteren wurde in der gleichen Kohorte der Verlust des MHC1 Proteins sowie die Expression des PD-L1 erhoben.

Im Rahmen dieser beiden Arbeiten soll dabei insbesondere auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

- Wie verhalten sich bestimmte Gene, welche mit der MHC-1 und MHC-2 Komplex vermittelten Antigenpräsentation assoziiert sind im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe? Zeigt sich im Tumorgewebe eine veränderte Genregulation, um einer MHC-Komplex vermittelten Phagozytose von entarteten Zellen entgegen zu wirken?
- Besteht eine Veränderung des T-Zellstatus bzw. der Regulation von hiermit assoziierten Genen (CD3, CD8 etc.) zwischen bereits neoadjuvant vorbehandelten und primär resezierten EACs?

- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Umfang und der Lokalisation des T-Zellinfiltrats in EACs und dem Overall Survival? Besteht hier ein Unterschied in der Relevanz der Infiltration des Tumorzentrums und der Invasionszone?
- Wie verhält sich die Regulation der Gene von verschiedenen bekannten Immun Checkpoints (CTLA-4, CD-276, TIM-3, LAG-3, PD-1 und PD-L1)? Könnten hier Ansatzpunkte für eine mögliche Therapie mit Immun Checkpoint Inhibitoren bestehen?
- Besteht ein Unterschied in der Expression der sogenannten „tumor inflammation signature“ Gene zwischen Therapie-naiven und neoadjuvant vorbehandelten EACs und zeigt sich hier eine mögliche Korrelation zum Gesamtüberleben der beiden verschiedenen Gruppen?
- Zeigen sich Unterschiede der Genexpressionen bei neoadjuvant vorbehandelten Tumoren im Vergleich zwischen chemotherapeutisch- und radiochemotherapeutisch vorbehandelten EACs?
- Kann anhand von MHC1 Verlust und PD-L1 Expression eine prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben festgestellt werden?

3. Publikationen

3.1 Distribution of tumor-infiltrating-T-lymphocytes and possible tumor-escape mechanisms avoiding immune cell attack in locally advanced adenocarcinomas of the esophagus



Distribution of tumor-infiltrating-T-lymphocytes and possible tumor-escape mechanisms avoiding immune cell attack in locally advanced adenocarcinomas of the esophagus

M. Schoemmel² · H. Loeser² · M. Kraemer² · S. Wagener-Rydzek² · A. Hillmer² · C. Bruns¹ · M. Thelen³ · W. Schröder¹ · T. Zander³ · A. Lechner⁴ · R. Buettner² · H. Schlösser¹ · F. Gebauer¹ · A. Quaas · Gastrointestinal Cancer Group Cologne (GCGC)

Received: 2 December 2020 / Accepted: 15 January 2021 / Published online: 10 February 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Introduction The inflammatory microenvironment has emerged as one of the focuses of cancer research. Little is known about the immune environment in esophageal adenocarcinoma (EAC) and possible tumor-escape mechanisms to avoid immune cell attack.

Patients and methods We measured T cell inflammation (CD3, CD8) in the microenvironment using a standardized software-based evaluation algorithm considering different predefined tumor areas as well as expression of MHC class 1 and PD-L1 on 75 analyzable primarily resected and locally advanced ($\geq$ pT2) EACs. We correlated these findings statistically with clinical data.

Results Patients with high amounts of T cell infiltration in their tumor center showed a significant survival benefit of 41.4 months compared to 16.3 months in T cell poor tumors ($p=0.025$), although CD3 fails to serve as an independent prognostic marker in multivariate analysis. For the invasion zone, a correlation between number of T-cells and overall survival was not detectable. Loss of MHC1 protein expression on tumor cells was seen in 32% and PD-L1 expression using the combined positive score (CPS) in 21.2%. Most likely due to small numbers of cases, both markers are not prognostically relevant, even though PD-L1 expression correlates with advanced tumor stages.

Discussion Our analyses reveal an outstanding, though not statistically independent, prognostic relevance of T-cell-rich inflammation in our group of EACs, in particular driven by the tumor center. For the first time, we describe that the inner part of the invasion zone in EACs shows significantly fewer T-cells than other tumor segments and is prognostically irrelevant. We also demonstrate that the loss of antigen presenting ability via MHC1 downregulation by the carcinoma cells is a common escape mechanism in EACs. Future work will need to show whether tumors with MHC class 1 loss respond less well to immunotherapy.

Keywords Adenocarcinoma of the esophagus · Inflammation · Computer applications software · MHC1 · PD-L1

M. Schoemmel, H. Loeser, F. Gebauer and A. Quaas contributed equally to this work.

✉ H. Loeser
heike.loeser@uk-koeln.de

¹ Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Cologne, Germany

² Institute of Pathology, University-Hospital of Cologne, University of Cologne, Kerpener Strasse 62, 50937 Cologne, Germany

³ Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology (CIO), University of Cologne, Cologne, Germany

⁴ LMU University-Hospital Head-Neck-Department, Munich, Germany

Introduction

Esophageal adenocarcinoma (EAC) is associated with the sixth-highest cancer-related mortality. Its incidence has increased rapidly in Western countries including Europe, North America and Australia [1, 2]. Despite improvements in perioperative treatments, the overall survival of patients throughout all tumor stages remains low with only 20% of patients surviving for more than 5 years [3–5].

In recent years, the inflammatory microenvironment has emerged as one of the focuses of cancer research and many publications have further supported the hypothesis of the immune system's influence on cancer development and recurrence after cancer therapy, thus having a direct impact on disease-free and overall survival [6–8]. For EAC, a few studies with up to 130 cases of EAC showed a favourable outcome in tumors with high numbers of CD3- or CD8-positive T-cells [9–13].

In colon carcinoma, both the overall inflammation and the particular effect of special subtypes of tumor-infiltrating lymphocytes demonstrated that the number, type and location of tumor immune infiltrates have prognostic power and might be a superior way to classify those tumors over the AJCC/UICC TNM classification [14–19]. Recently, a publication described the relevance of a precise spatial subdivision of the invasion zone with respect to T cell distribution in colon carcinoma [20]. Nothing is known about the distribution and prognostic impact of T-cells in EAC.

MHC1 loss is a well-known escape mechanism of tumor cells to avoid T cell attack—there are no reliable findings about the frequency of MHC1 loss on the tumor cells of EACs.

For PD-L1, a well-defined immune checkpoint marker, conflicting data exist in EAC. This is among other things due to different analysis and especially scoring methods used in the past [21, 22]. The combined positive score (CPS) for PD-L1 was established for gastric and gastroesophageal junction adenocarcinomas serving as a predictive marker for PD1-inhibitor therapy [23]. Actually, clinical studies indicate a better progression-free and overall survival for PD1 treatment in tumors with PD-L1 positivity according to the CPS [24, 25].

Locally advanced EACs are particularly qualified for immune checkpoint blockade because of their limited (systemic) treatment options.

The aim of this work is to determine the extent and spatial distribution of T cell inflammation and its prognostic significance in a group of locally advanced ($\geq$ pT2) primary resected EACs and to correlate these findings with possible tumor-resistance mechanisms against T cell attack.

Our hypothesis is that EACs are heterogeneously enriched with T-cells considering the tumor center and the

tumor invasion zone. Furthermore, we assume that T-cell-rich EACs have a better prognosis in locally advanced tumor stages and that MHC class 1 loss is an important and in EAC underestimated tumor-escape mechanism.

We used a standardized software-based evaluation algorithm to measure T cell inflammation and its distribution within the tumor very precisely, objectively and reproducibly.

Patients & methods

Patients and tumor samples

Formalin-fixed and paraffin embedded tumor tissue of 99 patients with esophageal adenocarcinomas that underwent primary surgical resection therapy between 2013 and 2017 at the Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Germany was analyzed. The standard surgical procedure consisted of a transthoracic en-bloc esophagectomy with two-field lymphadenectomy (abdominal and mediastinal lymph nodes), reconstruction by formation of a gastric tube with intrathoracic esophago-gastrostomy (Ivor-Lewis esophagectomy) [26]. Technical details of this operation are described elsewhere [27–29]. Follow-up data were available for all patients (Table 1). All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The present study was approved by the University of Cologne Ethics Committee (reference number 20-1393) and written informed consent was obtained from all patients.

Table 1 Patients' clinical and patho-anatomical tumor characteristics

		<i>n</i> = 99	%
Sex	Male	90	90.7
	Female	9	9.3
Age group	< 69	53	53.2
	> 69	46	46.8
Tumor stage	pT2	28	28.0
	pT3	67	68.0
	pT4	4	4.0
Lymph node metastasis	pN0	20	20.0
	pN +	79	80.0
Grading	G1	0	0
	G2	34	34.7
	G3	65	65.3

Immunohistochemistry

Immunohistochemical stainings were performed on full tumor sections using the BOND MAX from Leica (Wetzlar, Germany) according to the protocol of the manufacturers. We used the following antibodies and protocols: CD3 (rabbit monoclonal, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany, citrate buffer 1:50), CD8 (mouse monoclonal, Dako Agilent, Waldbronn, Germany, citrate buffer 1:200), PD-L1 (rabbit monoclonal, clone 28–8 Abcam, Berlin, Germany, EDTA 1:100), MHC class 1 (and HLA A, HLA B) (rabbit monoclonal, Abcam, citrate 1:300).

Software-based analysis of T cell infiltration

For the purpose of quantifying CD3- and CD8-positive T cells, slides were scanned using a NanoZoomer S360 (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Germany) slide scanner. Subsequently, the analysis was performed using Visiopharm Analysis software (Munich, Germany). Tumor areas were defined as region-of-interest and divided into three parts: tumor center and tumor infiltration margin, further sub-divided into areas 50 μm above the infiltration margin (direction to the tumor center) and 300 μm beyond the infiltration border. All quantitative measurements were normalized to the total amount of counted cells.

Strategy of evaluation of PD-L1 and MHC1

Two pathologists (A.Q. and H.L.) independently of each other scored PD-L1 and MHC class 1 manually. Scoring of PD-L1 followed the recommendations for gastroesophageal cancer. The CPS is defined as PD-L1-positive immune (including macrophages and lymphocytes) and tumor cells in proportion to all tumor cells and multiplied with 100. For MHC1, a homogenous and heterogeneous MHC1 expression on tumor cells was assessed as positive and homogenous loss of expression was counted as MHC1-negative (= MHC1 loss).

Statistical analysis

Clinical data were collected prospectively according to a standardized protocol. SPSS Statistics for Mac (Version 21, SPSS) was used for statistical analysis. Interdependence between stainings and clinical data was calculated using the chi-squared and Fisher's exact tests, and displayed by cross-tables. Group differences were calculated by the t-test or ANOVA, respectively. Univariate cox-regression analysis was performed for determination of interdependence between survival time and number of T-cells in the tumor. Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method and analyzed using the log-rank test. All tests were

two-sided. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients' cohort

In total, 99 patients were fully analysable with a median age of 69 years (range 40–86 years). The patient cohort consisted of 90 men (90.9%) and 9 women (9.1%) (Table 1). Most adenocarcinomas analyzed here presented with a diffuse or solid tumor pattern and were classified as G3 (65.3%; Table 1). The median follow-up for the entire patients' cohort was 40.7 months, observed death events were available from 85 patients (85.9%), 14 patients (14.1%) were still at life at the time of analysis and were censored. Only patients without neoadjuvant treatment prior to surgery were included in this analysis. The patients are stratified for preoperative therapy concepts according to pre-interventional diagnostic methods, which can lead to over- or understaging of the clinical tumor stage. Hence, in our patient cohort, tumors, which were understaged prior surgery, are included. Another aspect is that some patients are not suitable for neoadjuvant therapy due to comorbidity or aphagia. Furthermore, one tumor in our study revealed microsatellite instability and was excluded from statistical analysis.

T cell infiltration

The total number of T-cells differed significantly between the tumor center and the outer and inner infiltration zone (Fig. 1a). For the tumor center, a median number of 29,800 T-cells were calculated (range 800–427,000), the outer invasive margin showed a median of 5700 cells (range 490–51,000) and the inner invasive margin a median number of 1260 T-cells (range 60–11,800) ($p < 0.001$). The cumulative area, as calculated by the total surface area covered by T-cells, showed similar results (Fig. 1b). The number of T-cells normalized to the tumor area (T-cells/ mm^2) showed no significant differences between the three areas within the tumor (Fig. 1c).

For dichotomous division of the continuous variable, the absolute T cell number was divided into a high and a low inflammatory group based on the upper quartile (75th percentile) (Table 2). There was a strong correlation of T cell richness between the outer and inner infiltration margins, as only four patients (4.0%) were considered CD3 high at the inner infiltration zone and CD3 low at the outer infiltration zone. The remaining patients were either low or high for CD3 in both infiltration zones ($p < 0.001$). The correlation between the infiltration zones and tumor center showed also a strong statistical correlation. However, within the group of

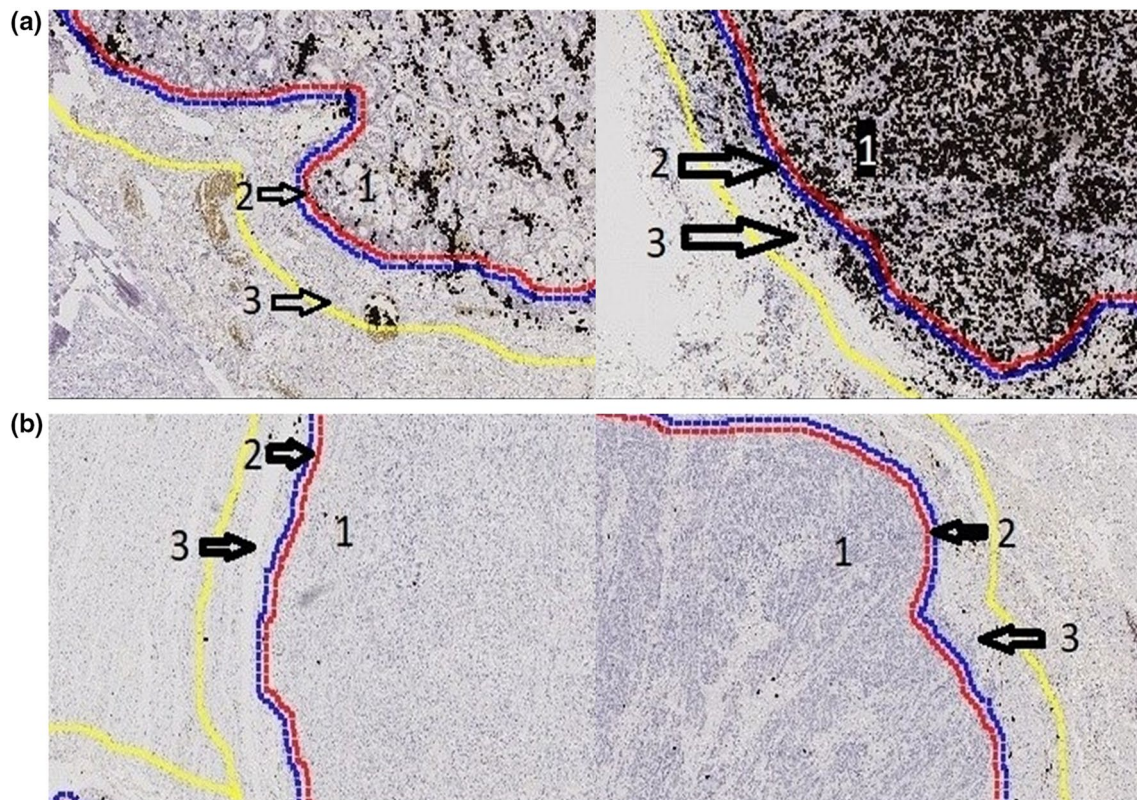


Fig. 1 Density of T-cells considering different tumor areas. Variation of the total number of T-cells (a), the cumulative area of (b) and the density of T-cells (c) in the in outer and inner infiltration margin and tumor center

Table 2 Correlation of T cell infiltration (CD3) with clinical characteristics

		CD3 outer infiltration zone					CD3 inner infiltration zone					CD3 tumor center				
		Low		High		<i>p</i> value	Low		High		<i>p</i> value	Low		High		<i>p</i> value
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Sex	Male	68	75.6	22	24.4	1.000	67	74.4	23	25.6	0.448	69	76.7	21	23.3	0.684
	Female	7	77.8	2	22.2		8	88.9	1	11.1		6	66.7	3	33.3	
Age group	<69	40	85.1	7	14.9	0.059	39	83	8	17	0.159	36	76.6	11	23.4	1.000
	>69	35	67.3	17	32.7		36	69.2	16	30.8		39	75.0	13	25.0	
Tumor stage	pT2	21	77.8	6	22.2	0.563	19	70.4	8	29.6	0.490	36	70.4	11	29.6	0.671
	pT3	51	73.9	18	26.1		53	76.8	16	23.2		39	78.3	13	21.7	
	pT4	3	100.0	0	0		3	100	0	0		2	66.7	1	33.3	
Lymph node metastasis	pN0	15	75.0	5	25.0	1.000	14	70	6	30.0	0.562	12	60.0	8	40.0	0.082
	pN+	60	75.9	19	24.1		61	77.2	18	22.8		63	79.7	16	20.3	

CD3 high patients in the tumor center, only 55.0% ($n=8$) and 66.0% ($n=13$) of the tumors were also CD3 high at the infiltration zones (inner and outer, respectively) ($p<0.0001$, respectively). In total, from patients with CD3 low in the tumor center 11 (11.1%) were considered CD3 high at the outer infiltration zone and eight patients (8.1%) at the inner infiltration zone.

A linear regression model was performed to assess a correlation between the number of CD3 and CD8 cells for each tumor area. A strong correlation between CD3+ and CD8+ cells could be seen in every single tumor area, the correlation coefficient (R) was 0.879 for the outer invasive margin, 0.857 for the inner invasive margin and 0.885 for the tumor center ($p<0.001$, respectively).

To assess the influence of T cell infiltration with respect to survival time, univariate cox-regression analysis was performed. For the infiltration zone, a correlation between number of T-cells and overall survival (OS) could not be shown. For the tumor center, a correlation was present. However, the hazard ratio was small (hazard ratio 0.999 (0.9999–1.000, $p=0.023$)) due to relatively small changes in the survival time in dependence of the increasing T cell number.

Subsequently, according to the upper quartile, dichotomous group comparisons were performed using Kaplan–Meier survival analysis. High numbers of T-cells in the infiltration zone, both outer and inner infiltration margin, did not affect OS (Fig. 2a and b). Considering the median survival after tumor resection, high amounts of T cell infiltration in the tumor center showed a significant prognostic effect of 41.4 months (95% confidence interval (95%CI) 22.1–60.1 months) compared to 16.3 months in T cell poor tumors (95%CI 8.7–22.4 months, $p=0.025$). CD3 high tumors at any of the infiltration zones but not in the tumor center did not affect the OS (Fig. 2c) ($p=0.344$). Therefore,

only tumors with high CD3 expression in the tumor center are associated with a better OS, demonstrating that the overall T cell infiltration in the tumor center is prognostic in EAC. However, in multivariate analysis, CD3 expression fails to serve as an independent prognostic marker (Table 3).

PD-L1 expression and MHC class 1 (HLA A, HLA B)

To measure PD-L1 expression, the combined positivity score (CPS) was used and PD-L1 positivity was defined as a CPS > 1. 12 patients (21.2%) revealed as PD-L1 positive with a CPS of more than 1 (2–100) (Fig. 4a + b, Table 4). Loss of MHC class 1 expression on tumor cells was seen in 31 patients (32.0%, Fig. 4c + d, Table 4). A high PD-L1 expression was associated with advanced tumors ($p=0.009$) in cross-table analyses. However, the calculated p values are statistically significant, but the results must be interpreted carefully due to the small number of 12 PD-L1-positive and 31 MHC1-negative cases. A correlation between MHC1 loss and clinical features could not be revealed (Table 4).

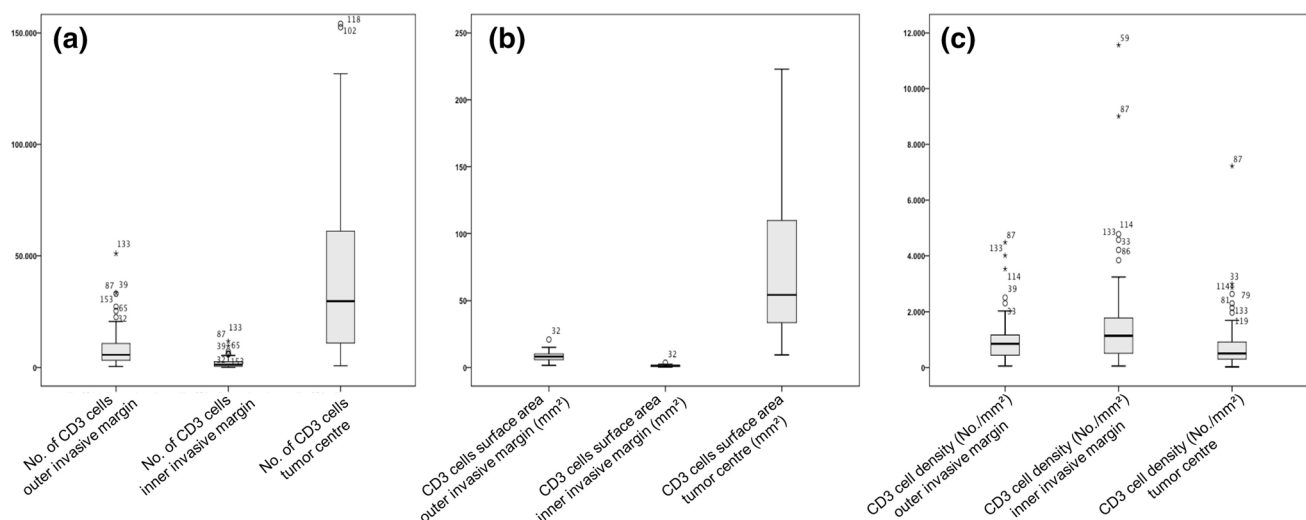


Fig. 2 Overall-survival (Kaplan–Meier) depending on the T cell localization within the tumor. Compared overall survival of patients considering the T cell inflammation (high and low) at the outer invasive margin (a), inner invasive margin (b) and tumor center (c)

Table 3 Multivariate cox-regression analysis for the impact of CD3+ cells in the tumor on overall survival (HR hazard ratio)

	Outer infiltration zone				Inner infiltration zone				tumor center			
	HR	95% confidence interval		<i>p</i> value	HR	95% confidence interval		<i>p</i> value	HR	95% confidence interval		<i>p</i> value
		Lower	Upper			Lower	Upper			Lower	upper	
Sex (male vs. female)	3.463	1.078	11.127	0.037	4.014	1.244	12.956	0.020	3.652	1.135	11.753	0.030
Age group (<65 yrs. vs > 65 yrs)	1.330	0.795	2.225	0.277	1.338	0.806	2.221	0.260	1.246	0.756	2.054	0.389
pT (pT2 vs pT3/4)	1.507	1.017	2.234	0.041	1.455	0.982	2.155	0.061	1.457	0.976	2.174	0.065
pN_(pN0 vs pN+)	3.723	1.752	7.913	0.001	3.836	1.796	8.191	0.001	3.562	1.668	7.604	0.001
CD3+ (low vs high)	0.660	0.359	1.212	0.180	0.596	0.321	1.107	0.101	0.709	0.372	1.349	0.295

Table 4 Correlation of expression of MHC1 and PD-L1 with clinical characteristics

		MHC1					PD-L1 (CPS)				
		Loss		High		<i>p</i> value	Negative		Positive		<i>p</i> value
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Sex	Male	29	39.2	59	60.8	0.714	78	78.8	12	21.2	0.595
	Female	2	22.7	7	77.3		9	9.0	0	91.0	
Age group	<69	18	39.1	28	60.9	0.192	45	95.7	2	4.3	0.030
	>69	13	25.5	38	74.5		42	80.8	10	19.2	
Tumor stage	pT2	11	40.7	16	59.3	0.286	23	85.2	4	14.8	0.009
	pT3	20	29.9	47	70.1		63	91.3	6	8.7	
	pT4	0	0	3	100		1	33.3	2	66.7	
Lymph node metastasis	pN0	7	35.0	13	65.0	0.791	19	95.0	1	5.0	0.450
	pN+	24	31.2	53	68.8		68	86.1	11	13.9	

Neither MHC class 1 loss nor PD-L1 expression was correlated with OS in Kaplan–Meier analysis ($p=0.123$ and $p=0.232$, respectively). A correlation between the number of CD3+ and CD8+ cells and MHC class 1 or PD-L1 expression was not detectable in cross-table analysis (data not shown).

Discussion

Our study takes into account a standardized, commercially available software-based evaluation algorithm considering large tumor sections. Image analyses offer a precise and reproducible measurement of T cell distribution in different parts of the tumor. It is well known that T cell infiltration correlates with outcome in EAC [14]. However, previous analyses of colon adenocarcinoma highlighted that

especially the T cell-enriched invasion zone is prognostically relevant [17]. Berthel et al. has recently demonstrated the relevance of a further subdivision of the invasion zone for the colon carcinoma [20]. Our software-based application allowed a precise subdivision of the invasion zone into a 50 μm thin inner, tumor-facing zone and a 300 μm wide outer zone (Fig. 3). For EAC, this is the first study analyzing the impact of T cell infiltration of the different tumor parts.

We see significant differences in T cell enrichment not only between different tumors, but also within the same tumors. The software-based analysis revealed large differences in the T cell abundance with fluctuations from 800 to 427,000 T-cells in the tumor center or from 60 to 51,000 T cells in the invasion zone. Therefore, the invasion zone has fewer total numbers of T-cells than the tumor center. Within the invasion zone, the inner zone hardly shows any T cell infiltration with a four time lower average than in

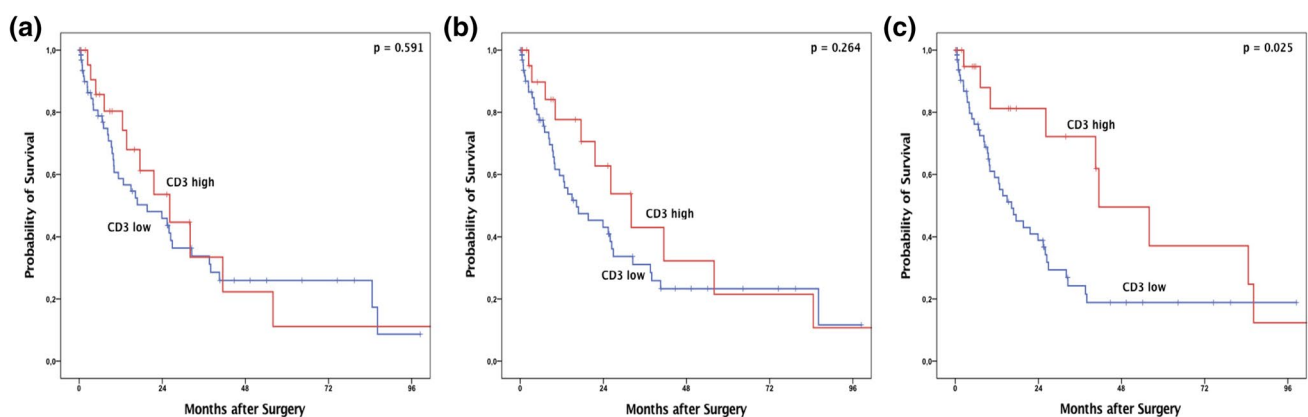


Fig. 3 Computer-based evaluation considering the tumor center and the invasion zone (divided into a 50 μm wide inner zone and a 300 μm wide outer zone) with regard to their T cell content (magnification $\times 200$). **a**: Two different tumors with high density of CD3 positive T-cells (black dots) separated in tumor center (1), tumor inner invasive margin (arrow 2: area between red and blue line; 50 μm) and

outer invasive margin (arrow 3: area between blue and yellow line; 300 μm). **b**: Two different tumors with low density of CD3 positive T-cells (just very few black dots) separated in tumor center (1) and tumor invasive margin (arrow 2: area between red and blue line; 50 μm) and outer invasive margin (arrow 3: area between blue and yellow line; 300 μm)

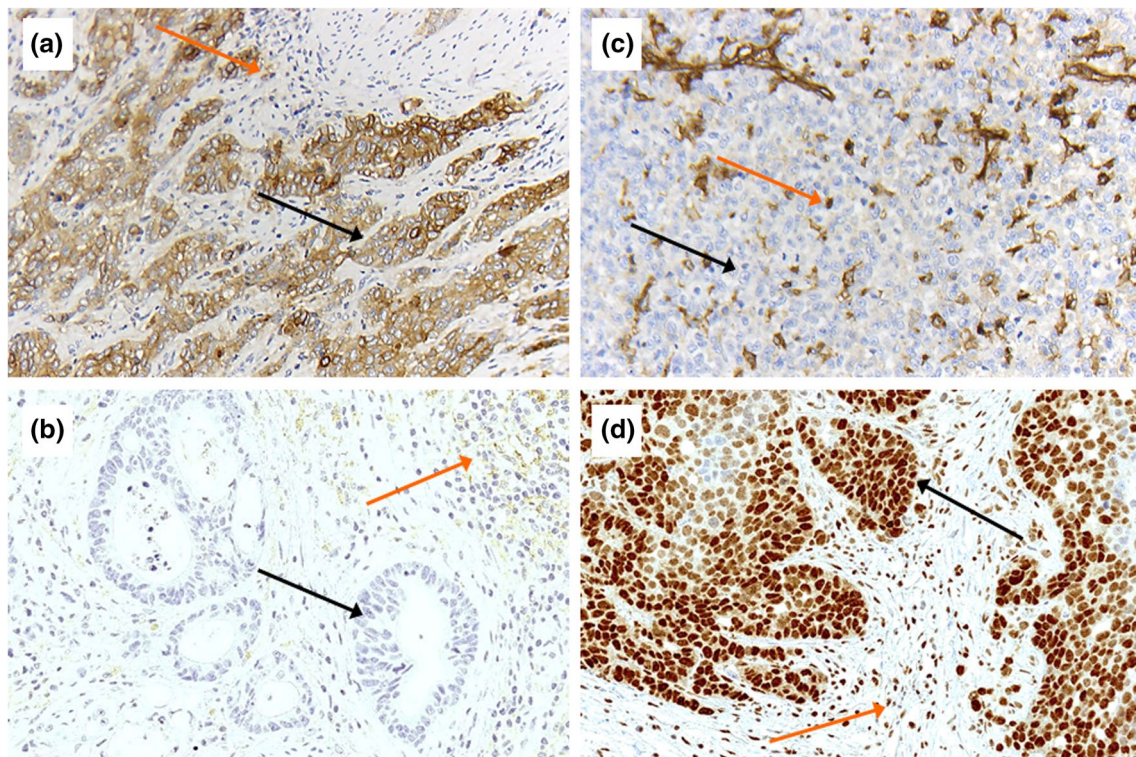


Fig. 4 Immunohistochemical detection of PD-L1 and MHC1. A + B: PD-L1 strongly positive (a) and with low expression (b) using the Combined Positive Score (CPS 100) (magnification $\times 200$). Black arrows show PD-L1 tumor cells positive (a) and negative (b). Orange arrows show PD-L1 positive inflammatory cells. C + D: MHC1 loss

(c) and preserved expression (d) (magnification $\times 200$). Black arrows show tumor cells with complete loss of MHC1 protein (c) and preserved nuclear staining (d). Orange arrows show internal positive control of MHC1 positive inflammatory cells

the outer zone (Fig. 3a and b). Anyway, we did not see any prognostic effect by considering the two different zones of the invasion zone separately from each other. But we can show a predictive relevance of T-cell-rich inflammation in EAC particularly driven by the T-cell-rich inflammation in the tumor center. This result is in line with the finding of a previous publication considering the tumor center of EAC using tissue micro-arrays [15].

The combination of a strong T-cell-enriched tumor center and a T-cell-enriched invasion zone does not increase the level of significance. T-cell-rich tumors are described in gastric carcinoma or colon carcinoma and are more commonly associated with DNA repair defects (e.g., microsatellite instability (MSI)) [30, 31]. However, esophageal adenocarcinomas do not fit in the four defined TCGA subgroups of gastric adenocarcinomas [32, 33]. So, the MSI-subtype is, in contrast to gastric adenocarcinomas, very rare in EAC. In our study cohort, we found microsatellite unstable EACs in only 0.6%, which was published previously [34]. This conforms to the TCGA data, where no MSI subtype was found in their cohort [32]. We were able to exclude a single MSI case from our (highly T-cell-rich) EACs.

Additionally, we considered two possible tumor-escape mechanisms: protein expression of PD-L1 on the tumor cells and corresponding inflammatory cells (CPS) as well as down-regulation of the neo-antigen presentation proteins of the MHC class 1 complex.

The effectiveness of a drug blockade of the PD-L1 / PD-1 axis has been impressively demonstrated in recent years in non-small cell lung carcinomas and malignant melanomas (among others) [35–37]. For EAC, first results of clinical studies are promising regarding a better prognosis for PD-1 therapies in PD-L1-positive tumors evaluated by CPS [24, 25]. The data on the extent and prognostic significance of PD-L1 expression in the EAC vary in the literature and ranges from 2.9% to 40% [38, 39]. These are the reasons for these differences of primary antibodies used against PD-L1 (we have used the FDA-approved clone 28-8) or the underlying evaluation criteria (Tumor proportion score (TPS) or combined consideration of carcinoma cells and inflammatory cells (CPS), which we applied, Fig. 4a).

Due to their mutational spectrum, tumors have many foreign proteins that present to the immune system via the MHC class 1 complex on the tumor cell surface. It suggests that down-regulation of MHC class 1 may be an effective

mechanism of tumor cells to evade detection by the immune system.

In fact, some studies have presented this mechanism as highly relevant or as a reason for lack of response rates for immune checkpoint inhibitor treatment [40, 41].

There are no reliable data on the frequency of MHC class 1 downregulation in EAC.

In our tumor cohort, we detected a MHC1 loss in 32% of the cases (Fig. 4b). Compared with other tumor entities, such as malignant melanoma, which shows an MHC1 downregulation in up to 45% of the cases, a comparable frequency can be found in EAC [42]. So, MHC class 1 loss could be a relevant tumor immune escape mechanism in EAC.

Possible limitations of our study are the retrospective character of the investigation and the sole analysis of surgical specimens. It would be interesting to determine the T cell content of primary endoscopic tumor biopsies to determine the predictive power of T cell inflammation prospectively, also in settings with applied immune checkpoint therapies.

Since our study has shown that the T-cell-rich tumor center is significantly prognostic and that well-obtained biopsy material can reach this tumor region, we can speculate that endoscopic material also produces comparable results.

Future clinical trials investigating the efficacy of checkpoint inhibitors in EAC will show how much the T cell-rich subtype of EACs and MHC1 tumor cell loss as a tumor-escape mechanism influence clinical response to therapy.

Author contributions Conceptualization: Alexander Quaas, Florian Gebauer; Methodology: Axel Lechner, Martin Thelen, Axel Hillmer, Alexander Quaas; Formal analysis and investigation: Max Schoemmel, Svenja Wagener-Rydzek, Florian Gebauer, Heike Loeser; Writing—original draft preparation: Max Schoemmel, Heike Loeser, Florian Gebauer; Writing—review and editing: Christiane Bruns, Reinhard Buettner; Resources: Wolfgang Schröder, Thomas Zander; Supervision: Alexander Quaas, Hans Schlösser.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Compliance with ethical standards

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

Ethics approval The study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital of Cologne (Ethics number: 20-1393).

Consent to participate Informed consent was obtained by all patients.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes

were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Edgren G, Adami HO, Weiderpass E, Nyren O. A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic. *Gut*. 2013;62(10):1406–14. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302412>.
- Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(4):232–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21185>.
- Maret-Ouda J, El-Serag HB, Lagergren J. Opportunities for Preventing Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016;9(11):828–34. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0170>.
- Gavin AT, Francisci S, Foschi R, Donnelly DW, Lemmens V, Brenner H, Anderson LA, Group E-W. Oesophageal cancer survival in Europe: a EUROcare-4 study. *Cancer Epidemiol*. 2012;36(6):505–12. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.07.009>.
- Njei B, McCarty TR, Birk JW. Trends in esophageal cancer survival in United States adults from 1973 to 2009: A SEER database analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(6):1141–6. <https://doi.org/10.1111/jgh.13289>.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93–103. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.189>.
- Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Cremer I, Fisson S, Damotte D, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;344:1–24. https://doi.org/10.1007/82_2010_46.
- Zingg U, Montani M, Frey DM, Dirnhofer S, Esterman AJ, Went P, Oertli D. Tumour-infiltrating lymphocytes and survival in patients with adenocarcinoma of the oesophagus. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36(7):670–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2010.05.012>.
- Rausser S, Langer R, Tschernitz S, Gais P, Jutting U, Feith M, Hoffer H, Walch A. High number of CD45RO+ tumor infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in non-metastasized (stage I-IIA) esophageal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10:608. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-608>.
- Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Can Res*. 2001;61(10):3932–6.
- Matthews LM, Noble F, Tod J, Jaynes E, Harris S, Primrose JN, Ottensmeier C, Thomas GJ, Underwood TJ. Systematic review and meta-analysis of immunohistochemical prognostic biomarkers in resected oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2015;113(12):1746. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.460>.
- Gokon Y, Fujishima F, Taniyama Y, Ishida H, Yamagata T, Sawai T, Uzuki M, Ichikawa H, Itakura Y, Takahashi K, Yajima N, Hagiwara M, Nishida A, Ozawa Y, Sakuma T, Kanba R, Sakamoto

- K, Zuguchi M, Saito M, Kamei T, Sasano H. Immune micro-environment in Barrett's esophagus adjacent to esophageal adenocarcinoma: possible influence of adjacent mucosa on cancer development and progression. *Virchows Arch*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02854-0>.
14. Noble F, Mellows T, McCormick Matthews LH, Bateman AC, Harris S, Underwood TJ, Byrne JP, Bailey IS, Sharland DM, Kelly JJ, Primrose JN, Sahota SS, Bateman AR, Thomas GJ, Ottensmeier CH. Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(6):651–62. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1826-5>.
 15. Stein AV, Dislich B, Blank A, Guldener L, Kroll D, Seiler CA, Langer R. High intratumoural but not peritumoural inflammatory host response is associated with better prognosis in primary resected oesophageal adenocarcinomas. *Pathology*. 2017;49(1):30–7. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.005>.
 16. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, Peng H, Cui L, Li C. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1595–605. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.46>.
 17. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
 18. Galon J, Fridman WH, Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Can Res*. 2007;67(5):1883–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4806>.
 19. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F, Galon J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):610–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5425>.
 20. Berthel A, Zoernig I, Valous NA, Kahlert C, Klupp F, Ulrich A, Weitz J, Jaeger D, Halama N. Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncoimmunology*. 2017;6(3):e1286436. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1286436>.
 21. Hynes CF, Kwon DH, Vadamudi C, Lofthus A, Iwamoto A, Chahine JJ, Desale S, Margolis M, Kallakury BV, Watson TJ, Haddad NG, Marshall MB. Programmed Death Ligand 1: A Step Toward Immunoscore for Esophageal Cancer. *Ann Thorac Surg*. 2018;106(4):1002–7. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsurg.2018.05.002>.
 22. Dislich B, Stein A, Seiler CA, Kroll D, Berezowska S, Zlobec I, Galvan J, Slotta-Huspenina J, Walch A, Langer R. Expression patterns of programmed death-ligand 1 in esophageal adenocarcinomas: comparison between primary tumors and metastases. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(6):777–86. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1982-2>.
 23. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, Ms MJ, Shah S, Hanks D, Wang J, Lunceford J, Savage MJ, Juco J, Emancipator K. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(3):330–7. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0043-OA>.
 24. Kato KJMS, Shah MA, Enzinger PC, Adenis A, Doi T, Kojima T, Metges J-P, Li Z, Kim S-B, Chul Cho BC, Mansoor W, Li S-H, Sunpaweravong P, Maqueda MA, Goekkurt E, Liu Q, Shah S, Bhagia P, Shen L. Abstract LBA8_PR - Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy as first-line therapy in patients with advanced esophageal cancer: The phase 3 KEY-NOTE-590 study. *Ann Oncol* 2020;31(4)
 25. Moehler KS, Garrido M, Salman P, Shen L, Wyrwicz L, Yamaguchi K, Skoczylas T, Campos Bragagnoli A, Liu T, Schenker M, Yanez P, Tehfe M, Poulart V, Cullen D, Lei M, Kondo K, Li M, Ajani JA, Janjigian YY. Abstract LBA6_PR 'Nivolumab (NIVO) plus chemotherapy (chemo) versus chemo as first-line (1I) treatment for advanced gastric cancer/gastroesophageal junction cancer (GC/GEJC)/esophageal adenocarcinoma (EAC): First results of the CheckMate 649 study' *Ann Oncol* 2020;31(4)
 26. Schroder W, Holscher AH, Bludau M, Vallbohmer D, Bollschweiler E, Gutschow C. Ivor-Lewis esophagectomy with and without laparoscopic conditioning of the gastric conduit. *World J Surg*. 2010;34(4):738–43. <https://doi.org/10.1007/s00268-010-0403-x>.
 27. Holscher AH, Schneider PM, Gutschow C, Schroder W. Laparoscopic ischemic conditioning of the stomach for esophageal replacement. *Ann Surg*. 2007;245(2):241–6. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000245847.40779.10>.
 28. Messenger M, Pasquer A, Duhamel A, Caranhac G, Piessen G, Mariette C, groupFRENCH Fw, . Laparoscopic Gastric Mobilization Reduces Postoperative Mortality After Esophageal Cancer Surgery: A French Nationwide Study. *Ann Surg*. 2015;262(5):817–22. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001470>.
 29. Mariette C, Markar SR, Dabakuyo-Yonli TS, Meunier B, Pezet D, Collet D, D'Journo XB, Brigand C, Perniceni T, Carrere N, Mabrut JY, Msika S, Peschaud F, Prudhomme M, Bonnetain F, Piessen G, Federation de Recherche en C, French Eso-Gastric Tumors Working G. Hybrid Minimally Invasive Esophagectomy for Esophageal Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(2):152–62. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805101>.
 30. Richards CH, Roxburgh CS, Powell AG, Foulis AK, Horgan PG, McMillan DC. The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50(2):309–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.09.008>.
 31. Kang BW, Kim JG, Lee IH, Bae HI, Seo AN. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes for gastric cancer in the era of immunology. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9(7):293–9. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v9.i7.293>.
 32. Cancer Genome Atlas Research N, Analysis Working Group: Asan U, Agency BCC, Brigham, Women's H, Broad I, Brown U, Case Western Reserve U, Dana-Farber Cancer I, Duke U, Greater Poland Cancer C, Harvard Medical S, Institute for Systems B, Leuven KU, Mayo C, Memorial Sloan Kettering Cancer C, National Cancer I, Nationwide Children's H, Stanford U, University of A, University of M, University of North C, University of P, University of R, University of Southern C, University of Texas MDACC, University of W, Van Andel Research I, Vanderbilt U, Washington U, Genome Sequencing Center: Broad I, Washington University in St L, Genome Characterization Centers BCCA, Broad I, Harvard Medical S, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins U, University of North C, University of Southern California Epigenome C, University of Texas MDACC, Van Andel Research I, Genome Data Analysis Centers: Broad I, Brown U, Harvard Medical S, Institute for Systems B, Memorial Sloan Kettering Cancer C, University of California Santa C, University of Texas MDACC, Biospecimen Core Resource: International Genomics C, Research Institute at Nationwide Children's H, Tissue Source Sites: Analytic Biologic S, Asan Medical C, Asterand B, Barretos Cancer H, BioreclamationIvt, Botkin Municipal C, Chonnam National University Medical S, Christiana Care Health S, Cureline, Duke U, Emory U, Erasmus U, Indiana University

- School of M, Institute of Oncology of M, International Genomics C, Invidumed, Israelitisches Krankenhaus H, Keimyung University School of M, Memorial Sloan Kettering Cancer C, National Cancer Center G, Ontario Tumour B, Peter MacCallum Cancer C, Pusan National University Medical S, Ribeiro Preto Medical S, St. Joseph's H, Medical C, St. Petersburg Academic U, Tayside Tissue B, University of D, University of Kansas Medical C, University of M, University of North Carolina at Chapel H, University of Pittsburgh School of M, University of Texas MDACC, Disease Working Group: Duke U, Memorial Sloan Kettering Cancer C, National Cancer I, University of Texas MDACC, Yonsei University College of M, Data Coordination Center CI, Project Team: National Institutes of H (2017) Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature* 541 (7636):169–175. <https://doi.org/10.1038/nature20805>
33. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–9. <https://doi.org/10.1038/nature13480>.
 34. Hewitt LC, Inam IZ, Saito Y, Yoshikawa T, Quaas A, Hoelscher A, Bollschweiler E, Fazzi GE, Melotte V, Langley RE, Nankivell M, Cunningham D, Allum W, Hutchins GG, Grabsch HI. Epstein-Barr virus and mismatch repair deficiency status differ between oesophageal and gastric cancer: A large multi-centre study. *Eur J Cancer*. 2018;94:104–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.014>.
 35. Conway JR, Kofman E, Mo SS, Elmarakeby H, Van Allen E. Genomics of response to immune checkpoint therapies for cancer: implications for precision medicine. *Genome Med*. 2018;10(1):93. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0605-7>.
 36. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7–H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):5094–100. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0428>.
 37. Salem ME, Puccini A, Xiu J, Raghavan D, Lenz HJ, Korn WM, Shields AF, Philip PA, Marshall JL, Goldberg RM. Comparative Molecular Analyses of Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Esophageal Adenocarcinoma, and Gastric Adenocarcinoma. *Oncologist*. 2018;23(11):1319–27. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0143>.
 38. Creemers A, Ebbing EA, Pelgrim TC, Lagarde SM, van Etten-Jamaludin FS, van Berge Henegouwen MI, Hulshof M, Krishnadath KK, Meijer SL, Bijlsma MF, van Oijen MGH, van Laarhoven HWM. A systematic review and meta-analysis of prognostic biomarkers in resectable esophageal adenocarcinomas. *Sci Rep*. 2018;8(1):13281. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31548-6>.
 39. Kollmann D, Ignatova D, Jedamzik J, Chang YT, Jomrich G, Baierl A, Kazakov D, Michal M, French LE, Hoetzenecker W, Schatton T, Asari R, Preusser M, Gnant M, Guenova E, Schoppmann SF. PD-L1 expression is an independent predictor of favorable outcome in patients with localized esophageal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(6):e1435226. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1435226>.
 40. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, Gjini E, Giobbie-Hurder A, Jin C, Chang H, Lovitch SB, Horak C, Weber JS, Weirather JL, Wolchok JD, Postow MA, Pavlick AC, Chesney J, Hodi FS. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med*. 2018. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar3342>.
 41. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997;18(2):89–95. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(96\)10075-x](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(96)10075-x).
 42. Jager E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jager D, Oesch F, Knuth A. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997;71(2):142–7. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970410\)71:2%3c142::aid-ijc3%3e3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970410)71:2%3c142::aid-ijc3%3e3.0.co;2-0).

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.2 Immune profile and immunosurveillance in treatment-naïve and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma



Immune profile and immunosurveillance in treatment-naïve and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma

Svenja Wagener-Rydzek² · Max Schoemmel² · Max Kraemer² · Christiane Bruns^{1,5} · Wolfgang Schroeder^{1,5} · Thomas Zander^{3,5} · Florian Gebauer^{1,5} · Hakan Alakus^{1,5} · Sabine Merkelbach-Bruse² · Reinhard Buettner² · Heike Loeser^{2,5} · Martin Thelen^{1,4} · Hans A. Schlößer^{1,4} · Alexander Quaas^{2,5}

Received: 6 May 2019 / Accepted: 31 December 2019 / Published online: 20 January 2020
 © The Author(s) 2020

Abstract

The outcome in esophageal adenocarcinoma (EAC) is still poor with only 20% of patients in Western populations surviving for more than 5 years. Almost nothing is known about the precise composition of immune cells and their gene expression profiles in primary resected EACs and also nothing compared to neoadjuvant treated EACs. This study analyzes and compares immune profiles of primary resected and neoadjuvant treated esophageal adenocarcinoma and unravels possible targets for immunotherapy. We analyzed 47 EAC in total considering a set of 30 primary treatment-naïve EACs and 17 neoadjuvant pretreated (12×CROSS, 5×FLOT) using the Nanostring's panel-based gene expression platform including 770 genes being important in malignant tumors and their immune microenvironment. Most of the significantly altered genes are involved in the regulation of immune responses, T- and B cell functions as well as antigen processing. Chemokine-receptor axes like the CXCL9, -10, -11/CXCR3- are prominent in esophageal adenocarcinoma with a fold change of up to 9.5 promoting cancer cell proliferation and metastasis. ARG1, as a regulator of T-cell fate is sixfold down-regulated in untreated primary esophageal tumors. The influence of the currently used neoadjuvant treatment revealed a down-regulation of nearly all important checkpoint markers and inflammatory related genes in the local microenvironment. We found a higher expression of checkpoint markers like LAG3, TIM3, CTLA4 and CD276 in comparison to PD-L1/PD-1 supporting clinical trials analyzing the efficacy of a combination of different checkpoint inhibitors in EACs. We found an up-regulation of CD38 or LILRB1 as examples of additional immune escape mechanism.

Keywords Esophageal adenocarcinoma · Immune profile · RNA expression · Nanostring

Abbreviations

ARG1 Arginase 1
 CTA Cancer testis antigen
 CCR3 C–C chemokine receptor type 3

CXCL9 Chemokine (C–X–C motif) ligand 9
 CD Cluster of differentiation
 CROSS CROSS-trial regimen with paclitaxel, carboplatin and 41.4 Gy/23 fractions
 CSM Consensus molecular subtype
 CTLA-4 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
 DNase Deoxyribonuclease
 EBV Epstein–Barr virus
 EAC Esophageal adenocarcinoma
 FC Fold change

Svenja Wagener-Rydzek and Max Schoemmel contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00262-019-02475-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Svenja Wagener-Rydzek
svenja.wagener-rydzek@uk-koeln.de

¹ Department of General, Visceral, Cancer and Transplantation Surgery, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

² Institute of Pathology, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

³ Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology (CIO), University Hospital Cologne, Cologne, Germany

⁴ Center for Molecular Medicine (CMMC), Cologne, Germany

⁵ Gastrointestinal Cancer Group Cologne (GCGC), Cologne, Germany

FFPE	Formalin-fixed and paraffin embedded
FLOT	FLOT-trial regimen with 5FU, Folinic acid, Oxaliplatin, Docetaxel
H&E	Hematoxylin–eosin
HAVCR2	Hepatitis A virus cellular receptor 2
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Human histocompatibility leukocyte Ag
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon-gamma
LILRB1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Micro ribonucleic acid
MSI	Microsatellite instability
mAb	Monoclonal Ab
NACT	Neoadjuvant chemotherapy
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
OS	Overall survival
PD-1	Programmed death 1 receptor
PD-L1	Programmed death ligand 1
RCT	Radio chemotherapy
RNA	Ribonucleid acid
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte
TIS	Tumor inflammation signature
TMB	Tumor mutation burden
TNF	Tumor necrosis factor

Introduction

Esophageal adenocarcinoma (EAC) is associated with the sixth-highest cancer-related mortality and increasing incidences mainly in the Western World [1, 2]. Curative treatment consists mostly of a multimodal therapy of esophageal en-bloc resection and perioperative radio-chemotherapy, but compared to other cancer entities the outcome is still poor with only 20% of patients in Western populations surviving for more than 5 years [3–5].

There is a high need for new therapeutic approaches in treating this cancer [6].

The interaction of tumor cells and associated immune compartment is supposed to play an important role in cancer progression. Mechanisms of immunosuppression within the tumor and its microenvironment are incompletely understood, although neoantigen loss and negative regulation by immune checkpoints are presumed to lead to dysfunction of specialized T-cells [7, 8].

Immune checkpoint inhibitors (e.g. Pembrolizimab, Nivolumab) enhancing antitumor T-Cell activity through

the inhibition of immune checkpoints, like the programmed death-1 (PD-1) receptor [9] and improved survival in some solid tumors like malignant melanoma and non-small cell lung carcinoma [10–13]. First line and second line treatment of metastatic esophageal cancer with checkpoint inhibitors considering the PD1/PDL1 axis are currently tested in a Phase III evaluation with pembrolizumab (KEYNOTE-062, KEYNOTE-061) [14] as well as nivolumab (CheckMate-577) in the adjuvant setting with various other approaches in all lines of therapy [15].

Almost nothing is known about the precise composition of immune cells and their gene expression profiles in primary resected EACs and also nothing compared to neoadjuvant treated EACs.

Due to the fact that most EACs are neoadjuvantly treated, the question arises as to what effects neoadjuvant treatment has on the local immune micromileu in carcinoma?

Accordingly one aim of our study was to analyze and compare the immune profile of primary resected as well as neoadjuvant treated esophageal adenocarcinoma and to unravel possible targets for immunotherapy as for example cancer testis antigens (CTA) that have been shown to exhibit characteristics important for tumorigenesis. Targeting such antigens may control cancer progression [16]. Additionally we compared the primary resected EACs in their regulation of genes known to be associated with response to PD-1/PD-L1 inhibitors. This so-called hot inflammation profile consists of 18 genes associated with a T cell-inflamed and IFN- γ -related response to antigen presentation, chemokine expression, cytotoxic activity, and adaptive immune resistance [17].

To address this question, we used the NanoString technology. Nanostring's panel-based gene expression platform, in particular, considers 770 genes that have been described as important in malignant tumors and their immune micromileu.

Materials and methods

Clinical characteristics of study cohort

We analyzed formalin-fixed and paraffin embedded material of 47 patients with esophageal adenocarcinomas (EAC). More than 80% ($n=40$) had locally advanced stages of EAC (T2 or more) and were predominantly men (89%) between 45 and 85 years old at the date of surgery.

Thirty patients (64%) received primary surgical resection (without neoadjuvant treatment) between 2014–2017 at the Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Germany. Standard surgical procedure was laparotomic or laparoscopic gastrotomy and right transthoracic en-bloc esophagectomy with intrathoracic

esophagogastrostomy including two-field lymphadenectomy of mediastinal and abdominal lymph nodes or transhiatal extended distal esophagectomy with transabdominal intrathoracic or cervical anastomosis as described previously described [18].

Seventeen patients (46%) had received neoadjuvant (radio)-chemotherapy. Four patients received chemotherapy alone according to the FLOT protocol (docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil/leucovorin), one patient according to the ECX protocol (epirubicin, cisplatin, capecitabine) and 12 patients a combined radio-chemotherapy according to the CROSS protocol (paclitaxel, carboplatin and 41.4 Gy/23 fractions). We considered patients with at least 50% remaining tumor tissue after neoadjuvant treatment. High quality RNA was extracted from tumor of all 47 patients for NanoString Analysis. Accordingly, RNA from tumor-free tissue of 10 patients in the primary naive tumor cohort was extracted as healthy normal control.

Macrodissection and RNA isolation

All samples were routinely formalin-fixed and paraffin embedded (FFPE) according to local practice. Histological specimens were evaluated by board certified pathologists. 10 µm thick sections were cut from FFPE tissue block for RNA extraction. Six sections of 10 µm thickness were deparaffinized and the tumor areas were macrodissected from unstained slides using a marked hematoxylin–eosin (H&E) stained slide as a reference. For extraction the Maxwell RSC RNA FFPE Kit was used on the Maxwell RSC (Promega) according to manufacturer's instruction, including DNase digestion.

Expression analysis

Differential expression of immune related genes on mRNA level was determined using the NanoString PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA). Isolated RNA was hybridised to a set of 770 specific and fluorescently labelled gene probes for 18 h @ 65 °C. Afterwards hybridisation products were prepared for cartridge loading on an nCounter PrepStation. Digital Counting of fluorescent signals was conducted using the nCounter Digital Analyzer. Afterwards data analysis including statistics was carried out with the nsolver3.0 software and the advanced analysis 2.0 package. 40 housekeeping genes within the panel facilitated sample-to-sample normalization.

Results

Immune profile in primary treatment-naive esophageal adenocarcinomas

We first analyzed a set of 30 primary treatment-naive EACs and compared these gene expression results to matched normal esophageal mucosa (Table 1). Most of the significantly altered genes are involved in the regulation of immune responses, T- and B cell functions as well as antigen processing (Sup. Figure 1 and 2).

Factors that interfere with the antigen processing machinery

Within the whole study population of primary and NACT treated tumors (see Table 1 for patients' characteristics), expression of MHC class I and II genes was upregulated in EAC compared to normal tissue (Fig. 1a). Nevertheless, we asked whether inhibition of macrophage phagocytosis by MHC class I could be altered in esophageal tumor specimen by an alternative way to interfere with antigen processing. We thereby identified LILRB1 to be significantly upregulated (fold change 2, $p=0.0005$). LILRB1 plays a major role as a receptor in the detection and simultaneous inhibition of MHC class I triggered phagocytosis (Fig. 1b).

T-cell status

In the group of therapy-naive tumors, the following deviations from the normal sample should be emphasized:

CTLA-4 expression is significantly increased in primary resected, treatment naive EAC ($p=0.01$) (Fig. 1c) as well as the costimulatory molecules CD80 and CD86 (Fig. 1c, d), which trigger higher interaction with CTLA-4. Further costimulatory and checkpoint molecules that are significantly overexpressed are CD70, which interacts with CD27 and TIM-3 (HAVCR2), which is also known as an important checkpoint molecule (Fig. 1c). Noteworthy also CD38 is overexpressed in primary esophageal tumors and represents a known mechanism of resistance to PD-1/PD-L1 blockade (Fig. 1b).

T-cells in treatment-naive- and post-radiochemotherapy (NACT) samples

T cell enrichment as measured by CD3 expression was found to be upregulated in treatment naive EACs by a factor of three in comparison to normal tissue (Fig. 1b). In contrast, post-NACT-treated samples presented a decrease in CD3 expression in comparison to treatment-naive samples, but present still a twofold normal tissue expression.

Table 1 Patients' characteristics

Neoadj.therapy	Naive		CROSS		FLOT		Total	
<i>n</i> = 47 (Eurasian)	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
	30	63,8	12	25,5	5	10,6	47	100
Sex								
M	26	55,3	11	23,4	4	8,5	41	87,2
F	4	8,5	1	2,1	1	2,1	6	12,8
Age								
> 50	29	61,7	9	19,1	5	10,6	43	91,5
< 50	1	2,1	3	6,4	0	0	4	8,5
T-stad								
(y)T1/2	10	21,3	4	8,5	1	2,1	15	31,9
(y)T3/4	20	42,6	8	17	4	8,5	32	68,1
N stage								
pN0	16	53,3	5	41,6	1	20	22	46,9
pN1	12	40,0	5	41,6	3	60	20	42,6
pN2	2	7,0	2	16,8	1	20	5	10,5
Number of pos lymphnodes	3,4 (0–21)		2,2 (0–12)		6,4 (0–14)		3,4 (0–21)	
Number of resected lymphnodes	30,9 (18–51)		29 (18–51)		34 (12–52)		30,8 (12–52)	
Tumor length	2,2 (1,0–4,5)		2,1 (1,0–4,1)		1,9 (0,9–3,9)			
Smoking								
Yes	13	43,3	1	9,1	0	0	14	
No	13	43,3	7	54,4	5	100	25	
Former smoker	4	13,3	4	36,5	0	0	8	

Expression of the T-cell co-receptor CD8, which binds the MHC-I on antigen presenting cells, is increased three-fold in tumor tissue regardless of therapy. CD8a expression varies between individual patient samples, nevertheless they all show a higher expression compared to normal tissue. CD8b receptor chain expression had a higher intra-group variability with some specimen showing expression values closely to normal expression. NACT was determined not to influence expression of CD8a and CD8b (expression of both CD8 chains alpha and beta was determined to remain stable under NACT). Within the top 50 genes, determined to be differentially expressed post NACT versus primary treatment-naïve EAC, none of the above mentioned genes are present (Fig. 2 and Sup Fig. 3).

Factors that interfere with the function of activated T cells

Expression of different immune checkpoints (CTLA-4, CD-276, TIM-3, LAG-3, PD-1 and PDL-1).

In the following we evaluate differences in expression between therapy-naïve tumors compared to the normal tissue and to neoadjuvant pretreated tumors (NACT): As already indicated, CTLA-4 expression is 3.5–4fold increased in esophageal tumor specimen compared to

normal tissue (Fig. 1c). We observed a low variability of CTLA-4 expression between different patient samples, except one tumor with a very high and one sample with a very low expression of CTLA-4. The immune checkpoint receptor CTLA-4 plays a crucial role in the negative regulation of T-cell activation of cancer cells to evade immune response and maintain self-tolerance. The PD-L1 expression in all (primary untreated as well as NACT)—tumor specimens investigated is only slightly increased compared to normal tissue (Fig. 1c). NACT treatment per se does not seem to have an effect on PD-L1 status. PD-1 shows a 2–3 fold expression in comparison to normal healthy tissue (Fig. 1c). Intra-group variation was astonishingly low except few outliers, known that PD-1 expression is heterogeneous in other cancer entities. PD-1 expression status does not seem to be different in NACT treated samples.

Besides CTLA-4 and PD-1/PD-L1, there are further upcoming immune checkpoints gaining attention in pre-clinical trials for specific blocking antibodies (e.g. LAG3, TIM-3).

HAVCR2 (TIM-3) exhibits a threefold increased expression in esophageal tumor samples compared to normal control samples (Fig. 1c). Further, we evaluated whether TIM-3 expression is influenced by NACT and found no differential expression between both patient groups. LAG3 shows a fourfold higher expression in primary untreated

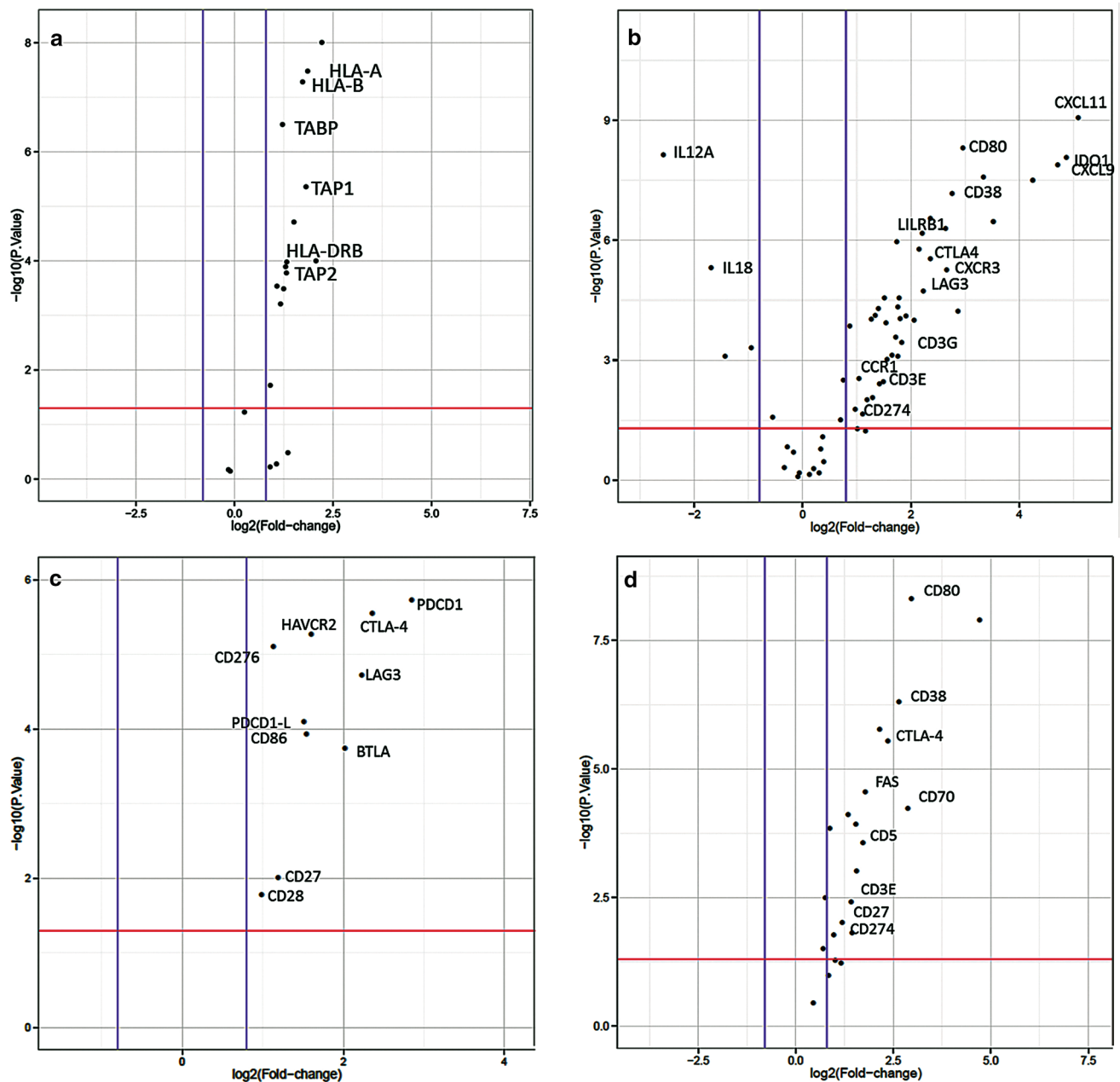


Fig. 1 Differential expression of immune-related genes. Upregulated expression of genes related to **a** antigen presentation. ‘Volcano plot’ of statistical significance against fold-change between primary EAC and normal tissue, demonstrating the significantly differentially expressed genes of MHC class I and II. **b** Expression of genes related to T-cell function. ‘Volcano plot’ of statistical significance against fold-change between primary EAC and normal tissue, demonstrating the significantly differentially expressed genes, CD3E, CD3G, LAG3, CTLA-4, LILRB1, CD38. **c** Expression of checkpoint genes.

‘Volcano plot’ of statistical significance against fold-change between primary EAC and normal tissue, demonstrating the significantly differentially expressed of PDCD1, CTLA-4, HAVCR2, CD276, LAG3, PDCD1-L1, CD86, BTLA, CD27 and CD28. **d** Expression of genes related to B-cell function. ‘Volcano plot’ of statistical significance against fold-change between primary EAC and normal tissue, demonstrating the significantly differentially expressed genes. Thresholds of significance p -value:1.3 (red line); $\log_2$ FC: 0.8 (blue lines)

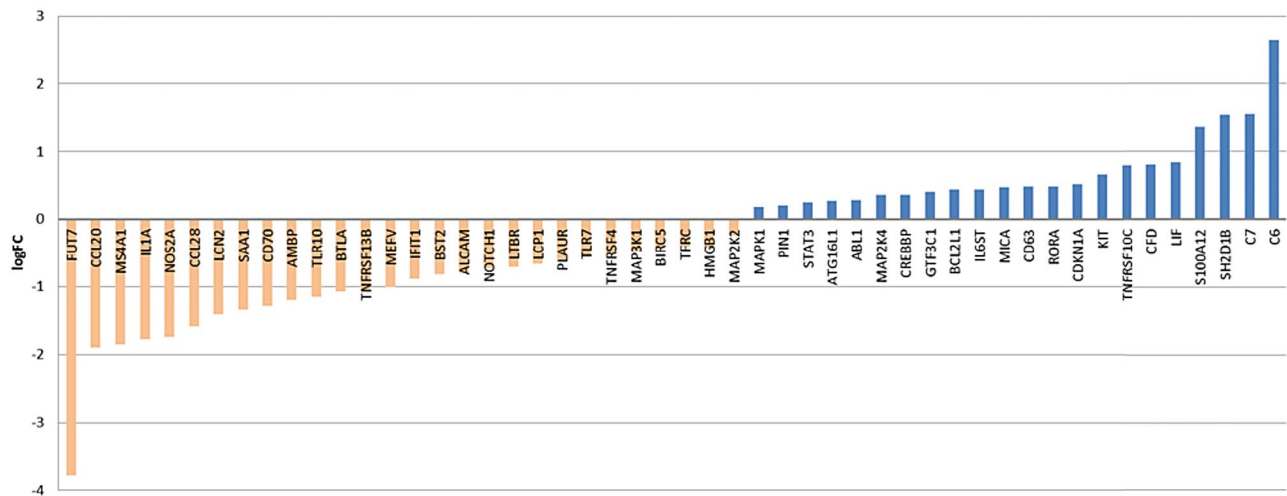


Fig. 2 Top 50 differentially expressed genes post NACT vs primary EAC. Waterfall plot for log₂ fold-changes in mRNA gene expression levels in post NACT vs primary resected, treatment-naïve EAC. Sig-

nificantly downregulated genes are marked in orange and upregulated genes are marked in blue

esophageal tumor in comparison to healthy normal tissue (Fig. 1c). In contrast to HAVCR2, LAG3 expression is strongly reduced by the factor of two in the neoadjuvant treated group.

CD-276 (also known as B7-H3) showed a significantly increased expression in primary naïve esophageal tumors as well. CD276 belongs to PD1-checkpoint family and elicits a similar inhibitory effect on T-cells as PD-1 does (Fig. 1c).

Secretion of immuno-modulating molecules

Noteworthy are in particular two markers (ARG1 and IDO1) that cooperate to establish an immunosuppressive tumor microenvironment. Both showed significant differences in expression to the normal tissue as well as to the neoadjuvant treated group:

ARG1, as a regulator of T-cell fate is sixfold downregulated in untreated primary esophageal tumors and fourfold downregulated in the NACT group in comparison to normal tissue.

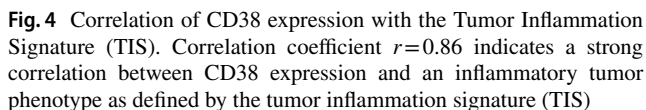
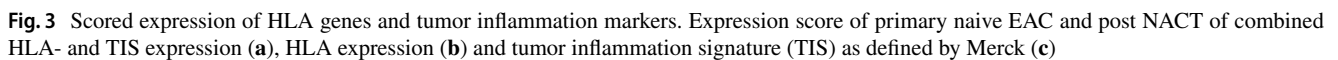
IDO-1, which induces tolerance to self-antigens via inhibition of T cell activation, exhibits a sevenfold higher expression in primary untreated esophageal tumor in comparison to healthy normal tissue (Fig. 1b), whereas it has a fourfold higher expression in NACT treated patients. Thus representing a twofold downregulation of IDO-1 by NACT therapy. Nevertheless there is a high intra-group variability of IDO-1 expression in different patients with 2–3 fold higher expression values.

Factors that interfere with homing of activated T cells

Immune cells are regulated by many different chemokines. Therefore, we thought to investigate, which chemokine-receptor axes are prominent in esophageal adenocarcinoma samples. Interestingly we found the CXCL9, -10, -11/CXCR3 (fold change 9.5, 8, 14 and 2.5 with $p=0.0005–0.0001$) axis to be significantly upregulated in the tumor tissue, promoting cancer cell proliferation and metastasis (autocrine axis) (Fig. 1b).

Expression of a Tumor inflammation signature that predicts response to immunotherapy

Primary untreated and neoadjuvant treated esophageal adenocarcinoma specimen were analyzed for their tumor inflammation signature, as developed by Merck and Nanostring to predict response to PD-1 blockade [19]. Afterwards samples were scored according to the sum of inflammation signature gene expression. Comparison of primary untreated to neoadjuvant treated esophageal adenocarcinoma specimen revealed HLA—and cancer testis antigens (CTA) expression to be comparable in both groups (Fig. 3a, b). Nevertheless, therapy-naïve esophageal tumor specimen showed a numerical higher inflammation signatures as well as HLA expression (Fig. 3c). As described above, we could show a high CD38 expression within primary EAC. To unravel possible combinatorial treatments we determined whether CD38 expression correlates with the tumor inflammation signature (TIS) (Fig. 4). We analysed the probability and duration of survival for primary-resected and neoadjuvantly treated EAC patients as shown in the Kaplan-Meier Curves



Differences in immune related gene expression upon different perioperative therapy protocols (FLOT vs. CROSS)

Volcano plot showing differential gene expression. The x-axis represents $\log_2(\text{Fold-change})$ and the y-axis represents $-\log_{10}(\text{P-Value})$. A red horizontal line indicates the significance threshold at $-\log_{10}(\text{P-Value}) \approx 1.3$. Two vertical blue lines indicate the fold-change threshold at $\log_2(\text{Fold-change}) \approx \pm 1.5$.

Genes labeled in the plot include:

- CCL15
- PSMB8
- TAP1
- IL27
- STAT1
- DOX43
- FOSL2
- MASP2
- CIRDL
- ZNF248
- MIR17
- GUCY1A
- GUCY1B3
- CD22
- PAX5
- CD19
- CXCL6
- SERPINE2
- TRPSF13B
- HLA-DQB1
- H2A1
- HLA-DRA
- CXCR5

comparison to neoadjuvant pretreated patients according to the CROSS protocol (radio-chemotherapy). Furthermore important factors of B cell activation (B cell receptor signaling) are significantly upregulated like the B cell receptor component CD79A, CD79B or its associated co-receptor genes CD19 and C21. In contrast we observed a

downregulation of MHC class I genes and the MHC I associated TAP transporter genes TAP1 and TAP2 (Fig. 5).

Discussion

Conventional oncological treatment regimens such as chemotherapy or radiotherapy are inadequate effective in EACs. Personalized therapy options are limited to HER2 blockade for a limited patient group showing a median advantage in progression-free survival of less than 3 months. Further therapy options are urgently needed.

Currently checkpoint-inhibitors like pembrolizumab and nivolumab which have proven to be effective, *inter alia*, in the treatment of malignant melanoma and NSCLCs are tested in different Phase III for esophageal cancer. First preliminary study results for pembrolizumab as a second-line treatment demonstrated an improved overall survival (OS) in patients with advanced or metastatic esophageal or esophagogastric junction carcinoma [20].

The structure of the studies available to date illustrates a significant problem. The studies mimic gastric adenocarcinomas with the adenocarcinomas of the esophagus (and subsume these as adenocarcinomas of the gastroesophageal junction) in the erroneous assumption that there are no relevant differences in tumor biology. As a matter of fact gastric adenocarcinomas reveal just for immunotherapy relevant subgroups such as microsatellite-instability (MSI) and Epstein–Barr-virus-related (EBV) subgroup, which are exceedingly rare or missing in adenocarcinomas of the esophagus [21, 22].

We have therefore focused on adenocarcinomas of the esophagus in this study.

The immune system interacts with esophageal adenocarcinomas in many ways and thereby substantially affects tumor progression and therapeutic response. Nearly nothing is known about these important interactions in EAC. Consequently the main focus of our study was to unravel the immune profile of EAC as defined by their T-cell activity, inflammation signature and immune escape mechanisms. Although most conventional therapies can elicit immune responses contributing to their efficacy, we could also show that radio-chemo therapy negatively alters the local immune status.

Other studies already identified molecular subtypes linked to the clinical outcome after immunotherapy. For example, different molecular subtypes have been identified in colorectal cancers which define potential strategies for immunotherapy [23]. Multiple characteristics are proposed to be responsible for a certain immune microenvironment as well as related mechanisms of immune escape. The consensus molecular subtype I (CSM I) for colorectal carcinoma is characterized by a high expression of PD-1, CTLA-4, IDO1

and other immune checkpoints. Moreover, its immune regulation is mainly driven by the chemokine CXCR3/CCR5 axis and cytotoxic effector mechanisms that are critical for activation and differentiation of T cells. CSM type IV in contrast is defined by an increased TGF- β signaling and upregulated CXCL-12, which drive inflammation and metastasis formation. Upon our findings, that primary untreated patients with EACs showed a high expression of major immune checkpoints as well as an upregulated CXCR3/CCR5 axis, it would be interesting to define prognostic phenotypes and thereby directing therapeutic strategies. In addition to this, we identified a subgroup of EAC patients with ultra-high expression of cancer testis antigens (CTAs), which displayed a significant upregulation of genes associated with tumor progression and metastasis formation. We therefore suspect, the score of CTAs to be a possible prognostic marker for clinical outcome in EAC as already identified for other tumor entities [16].

So far, neoadjuvant radiochemotherapy (RCT) is a well-established first-line treatment in patients with esophageal cancer. Nevertheless we here observed a significant decrease of T cell activity as measured by CD3 and CD8 expression after RCT. This finding implies that RCT impairs lymphocyte activity as well as components of the adaptive immune response, as targets of immunotherapy. Since the composition of the tumor microenvironment with immune cells and chemokines mainly drives efficacy of immunotherapy [24] and RCT profoundly suppresses the adaptive immune response, we propose that a combination of both could be restricted. Similar observations have been made in cervical and colorectal cancer patients [25, 26].

Restricting, however, we must state at this point that this explanation refers only to the local tumor micromileu. Memory cells in surrounding lymph nodes could trigger an effective neoantigen-driven tumor cell-destroying inflammatory response regardless of the local situation. Further it has to be kept in mind that the patient cohort of NACT-treated EAC includes only a small sample size. Nevertheless, these results can be an argument for clinical trials considering the use of checkpoint inhibitors first-line. We therefore propose to further validate the above described findings in future studies.

Controversely, we could not observe any upregulation of PD-1 expression upon chemotherapy as described previously [25, 26]. This might be due to the fact, that primary esophageal tumor samples show no differential expression of PD-1 and PD-L1 at all. This evidence further suggests that PD-1 blocking agents, which have shown to be promising in NSCLC and renal cancer as well as melanoma, might not be as effective in esophageal adenocarcinoma or at least just in a small subset of patients with EACs. Nevertheless, recent clinical trials reveal efficacy of checkpoint inhibitors also in PD-L1 low expressing patients. This phenomenon is

currently investigated [27] and noteworthy within our study, other checkpoint molecules like HAVCR2 (TIM-3), LAG-3 and CTLA-4 are dominantly expressed and therefore promising therapy markers/targets (see discussion below). Furthermore most EACs show a high mutational burden (TMB) which is correlated with good clinical response to checkpoint inhibition in NSCLC. Interestingly, a family member of PD-1, CD276 that even elicits similar inhibitory effects on T-cells is dominantly upregulated in primary EAC. Recently, CD276, also known as B7-H3, was identified to decrease levels of IFN- γ , TNF alpha and inflammatory cytokines and thereby allowing immune escape [28].

Tumor escape from anti-tumor immunity is a critical event for tumor survival and progression [29]. Different mechanisms have been described and discussed extensively in the past [30, 31]. These include loss of antigenicity by modulation of the antigen presenting machinery. Down-regulation of the antigen presenting MHC- class I has been found in various solid malignancies like melanoma, lung, breast and prostate cancers [32]. Primary EAC samples within our study cohort display increased MHC class I expression on mRNA level compared to normal tissue. In contrast IHC screening identified approximately 30% of EAC to have a loss of MHC marker expression on their tumor cell surface. Nevertheless we could identify other inhibitors of MHC class I-linked macrophage phagocytosis on mRNA expression level. Interestingly the major receptor in detection and simultaneous inhibition of MHC class I triggered phagocytosis, LILRB1, was significantly upregulated and could explain a possible tumor escape mechanism [33]. Further, tumors, which retain sufficient antigen presentation for immune recognition can still escape from elimination by downregulation of their immunogenicity, for example by the expression of immuno-inhibitory molecules (receptors and ligands) like PD-1/PD-L1, LAG3 and HAVCR2 (TIM-3) [30]. Also the microenvironment with infiltrating tumor lymphocytes (TILs) and T cell suppressing enzymes enhances immunoresistance. The ability of tumors to orchestrate this surrounding environment determines the cellular fate of TILs and allows evasion from immune elimination [34]. Enhancing efficacy of immunotherapy needs to consider immune escape mechanisms by immune profiling. Interestingly, within our cohort of primary naive esophageal carcinoma, distinct immune escape mechanisms are dominant, while others are not present. In detail, our cohort of primary EAC showed an upregulation of checkpoint inhibitors as most prominent mechanism of immune evasion with 7–4 fold increased expression of CTLA-4, HAVCR2 (TIM-3) and LAG3. Modulation of the tumor microenvironment as an enhancement of immunosuppression is prominent within primary naive EAC. We could identify high tumor inflammation signatures within nearly all patient samples compared to normal tissues. Approximately 50% of the samples

elicit an extremely high score of inflammation markers. Furthermore, we could show a high CD38 expression within primary EAC, which was recently determined to be influenced by CD8 + T-cells within the tumor microenvironment and consequently correlates with the tumor inflammation signature [35]. This further strengthens current approaches to combine anti-CD38 with checkpoint inhibitor therapy [36]. Primary EAC, presenting a high inflammation signature in combination with dominant CD8 and CD38 expression might be promising targets for such a combinatorial treatment.

Recently, radiochemotherapy was thought to increase the presence of neoantigens as a result of its mutagenic character [37]. In general, a greater overall survival as well as higher efficiency of immunotherapy with checkpoint inhibitors are associated with higher neoantigen burden and CD8 + T cell infiltration [38]. Nevertheless, we identified that even the presence of cancer testis antigens is significantly decreased after radiochemotherapy in esophageal carcinoma. This is in concordance with another study conducted in ovarian cancer, where the authors found the predicted increase in neoantigens to be due to pre-existing mutational processes rather than from mutagenesis induced by chemotherapy [38].

The present study demonstrated some important new findings: (a) the influence of the currently used neoadjuvant treatment, (b) the unexpected higher expression of checkpoint markers like LAG3, TIM-3, CTLA4 and CD276 in comparison to PD-L1/PD-1 supporting clinical trials analyzing the efficacy of a combination of different checkpoint inhibitors in EACs, (c) the importance of immune escape mechanism like a high CD38 or LILRB1 expression in EACs.

TIM-3, also known as HAVCR2 could be an interesting and promising target for anticancer immunotherapy, since it is expressed on a variety of T-cells, DCs (dendritic cells), macrophages and monocytes and elicits a strong innate anti-tumor immune response. A variety of different studies have proven comparable effects of anti TIM-3 inhibition [39]. PD-1, TIM-3 and LAG-3 inhibitors are able to enhance the T-cell response to tumor antigens. Moreover a synergistic function of the above mentioned could enhance the response in combinatorial therapies [40, 41]. LAG-3 as a further promising immune-checkpoint has been investigated in various clinical trials and combinatorial treatment with anti-PD1 therapy showed high efficacy especially in PD1 resistant settings [40].

An increased expression of CD38 is correlated with a poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia cells. Administration of the anti-CD38 mAb daratumumab has been shown to induce apoptosis and promotion of immune-initiated clearance [42]. A combinatorial screening of PD1/PD-L1 and CD38 could be of interest for diagnostics to predict response to PD-L1 blockade or even allow for

a combinatorial treatment with checkpoint inhibitors and CD38 blocking agents to improve patients' outcome.

Furthermore to further identify prognostic markers, a clinical follow up of patients with different immunoprofiles could be of high interest. Additionally to the relative low sample size within the cohort of NACT-treated EACs, it has to be kept in mind that this group is heterogeneous according to the type of treatment regimen. To strengthen the findings described within this study, a larger and homogeneous cohort of NACT-treated EAC patients could be tested in future research. Although heterogeneity of this sub-cohort, the herein described major influences of treatment to the immune profile are similar regardless of treatment regimen. There is a difference between FLOT and CROSS treated patients on gene expression as described in Fig. 5, but the major influence of NACT treatment (a down-regulation of nearly all important checkpoint markers and inflammatory related genes in the local microenvironment) is consistent between both subgroups.

Acknowledgements Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Author contribution SWR, MS and AQ designed the study, selected and reviewed cases and FFPE samples, conducted, analyzed and interpreted all experiments and wrote the manuscript. MK and HL helped with the review and processing of the FFPE sample cohort. CB, WS, TZ, FG and HA supported the project with patient material for the study cohort. SMB, RB, MT and HAS were involved in designing the project.

Funding No relevant funding.

Compliance with ethical standards

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

Ethical approval The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected by the approval of the institution's human research review committee (Ethics Committee of the Medical Faculty of University of Cologne: registration no.13-091). Patients gave their written consent to usage of their tumor specimen.

Informed consent All patients gave written informed consent to the use of their tumors and their data for research and publication.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Edgren G et al (2013) A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic. *Gut* 62(10):1406–1414
- Lagergren J, Lagergren P (2013) Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin* 63(4):232–248
- Maret-Ouda J, El-Serag HB, Lagergren J (2016) Opportunities for preventing esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res* 9(11):828–834
- Gavin AT et al (2012) Oesophageal cancer survival in Europe: a EURO-CARE-4 study. *Cancer Epidemiol* 36(6):505–512
- Njei B, McCarty TR, Birk JW (2016) Trends in esophageal cancer survival in United States adults from 1973 to 2009: a SEER database analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 31(6):1141–1146
- Kapoor H, Agrawal DK, Mittal SK (2015) Barrett's esophagus: recent insights into pathogenesis and cellular ontogeny. *Transl Res* 166(1):28–40
- Olson BM, McNeel DG (2012) Antigen loss and tumor-mediated immunosuppression facilitate tumor recurrence. *Expert Rev Vaccines* 11(11):1315–1317
- Dyck L, Mills KHG (2017) Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* 47(5):765–779
- Raufi AG, Klempner SJ (2015) Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations. *J Gastrointest Oncol* 6(5):561–569
- Ferris RL et al (2016) Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 375(19):1856–1867
- Borghaei H et al (2015) Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 373(17):1627–1639
- Motzer RJ et al (2015) Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 373(19):1803–1813
- Larkin J et al (2015) Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 373(1):23–34
- Bockorny B, Pectasides E (2016) The emerging role of immunotherapy in gastric and esophageal adenocarcinoma. *Future Oncol* 12(15):1833–1846
- Vrana D, Matzenauer M, Melichar B (2017) Current status of checkpoint inhibitors in the treatment of esophageal and gastric tumors - overview of studies. *Klin Onkol* 31(1):35–39
- Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ (2015) Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* 6(18):15772–15787
- Ayers M et al (2017) IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 127(8):2930–2940
- Holscher AH et al (2007) Laparoscopic ischemic conditioning of the stomach for esophageal replacement. *Ann Surg* 245(2):241–246
- Danaher P et al (2018) Pan-cancer adaptive immune resistance as defined by the tumor inflammation signature (TIS): results from the cancer genome atlas (TCGA). *J Immunotherapy Cancer* 6(1):63
- Merck, Merck's KEYTRUDA® (pembrolizumab) significantly improved overall survival (OS) compared to chemotherapy in patients with advanced esophageal or esophagogastric junction carcinoma whose tumors express PD-L1 (CPS ≥10). 2018.
- Hewitt LC et al (2018) Epstein-Barr virus and mismatch repair deficiency status differ between oesophageal and gastric cancer: a large multi-centre study. *Eur J Cancer* 94:104–114
- Cancer Genome Atlas Research N et al. (2017) Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature* 541(7636), 169–175.

23. Roelands J et al (2017) Immunogenomic classification of colorectal cancer and therapeutic implications. *Int J Mol Sci* 18(10)
24. Tang H, Qiao J, Fu Y-X (2016) Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett* 370(1):85–90
25. van Meir H et al (2016) Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. *Oncoimmunology* 6(2):e1267095–e1267095
26. Jarosch A et al (2018) Neoadjuvant radiochemotherapy decreases the total amount of tumor infiltrating lymphocytes, but increases the number of CD8+/Granzyme B+ (GrzB) cytotoxic T-cells in rectal cancer. *Oncoimmunology* 7(2):e1393133
27. Shen X, Zhao B (2018) Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* 362
28. Castellanos JR et al (2017) B7–H3 role in the immune landscape of cancer. *Am J Clin Exp Immunol* 6(4):66–75
29. Lin C-F et al (2017) Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci* 24(1):10
30. Beatty GL, Gladney WL (2015) Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 21(4):687–692
31. Rodriguez JA (2017) HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncol Lett* 14(4):4415–4427
32. Campoli M, Chang CC, Ferrone S (2002) HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 19(20):A40–A45
33. Barkal AA et al (2018) Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 19(1):76–84
34. Gajewski TF et al (2013) Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25(2):268–276
35. Chen L et al (2018) CD38-mediated immunosuppression as a mechanism of tumor cell escape from PD-1/PD-L1 blockade. *Cancer Discov* 8(9):1156–1175
36. Chen L et al (2018) Targeting CD38 to improve anti-PD-1/CTLA-4 combination therapy in lung cancer. *J Clin Oncol* 36(5):144–144
37. Brown JS, Sundar R, Lopez J (2018) Combining DNA damaging therapeutics with immunotherapy: more haste, less speed. *Br J Cancer* 118(3):312–324
38. O'Donnell T et al (2018) Chemotherapy weakly contributes to predicted neoantigen expression in ovarian cancer. *BMC Cancer* 18(1):017–3825
39. He Y et al (2018) TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *OncoTargets Therapy* 11:7005–7009
40. Long L et al (2018) The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer* 9(5–6):176–189
41. Marcq E et al (2017) Abundant expression of TIM-3, LAG-3, PD-1 and PD-L1 as immunotherapy checkpoint targets in effusions of mesothelioma patients. *Oncotarget* 8(52):89722–89735
42. Manna A et al (2018) Using anti-CD38 immunotherapy to enhance anti-tumor T-cell immunity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J Immunol* 200(1):58

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4. Diskussion

In den beiden als Grundlage für diese Arbeit verwendeten Studien wurde die Rolle der inflammatorischen Mikroumgebung in Adenokarzinomen des Ösophagus untersucht. Während im Paper *„Immune profile and immunosurveillance in treatment-naive and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma“* vor allem ein Augenmerk auf die Expression verschiedener mit der Immunantwort assoziierter Gene im Vergleich von Tumor und Normalgewebe auf der einen Seite und therapienaiven und (radio)chemotherapeutisch vorbehandelten Tumoren auf der anderen Seite gesetzt wurde, wurde in dem Paper *„Distribution of tumor-infiltrating-T-lymphocytes and possible tumor-escape mechanisms avoiding immune cell attack in locally advanced adenocarcinomas of the esophagus“* anhand des T-Zellumfangs und der T-Zell-Verteilung innerhalb des Tumors versucht eine Korrelation zur Prognose nachzuweisen.

Zunächst soll hier auf die Expression von Genen, welche mit der MHC1-vermittelten Antigenpräsentation assoziiert sind, in EACs eingegangen werden.

Die Möglichkeit der antitumoralen Immunreaktion zu entkommen („tumor escape“) ist ein kritischer Moment für das Überleben und die weitere Progression der Tumorentwicklung^{26,48}. Verschiedene dieser Mechanismen sind in der Vergangenheit diskutiert worden^{33,49}. Unter anderem spielt der Verlust der Antigenität durch Modulation der antigenpräsentierenden Maschinerie eine wichtige Rolle. Verminderte Expression des antigenpräsentierenden MHC-1 Komplexes konnte in verschiedenen soliden Tumorarten wie Melanomen, Bronchial- Mamma- und Prostatakarzinomen nachgewiesen werden⁵⁰. Im Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe konnte beim Vergleich der Gesamtkohorte eine deutliche Hochregulation von einigen dieser Gene (HLA-A, HLA-B, TAP1, TAP2) auf mRNA Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 1). In unserer zweiten Studie, die ein anderes Tumorkollektiv berücksichtigt, konnte bei einer deutlich größeren Kohortengruppe ein MHC1 Proteinverlust immunhistochemisch in 31 % der Tumore nachgewiesen werden. Verglichen mit anderen Tumorentitäten wie z.B. dem

malignen Melanom in denen eine Herunterregulation in bis zu 45 % nachgewiesen werden zeigen sich demnach in EACs vergleichbare Zahlen ⁵¹. Ein MHC1 Verlust könnte dementsprechend ein relevanter Mechanismus der Tumorescape darstellen.

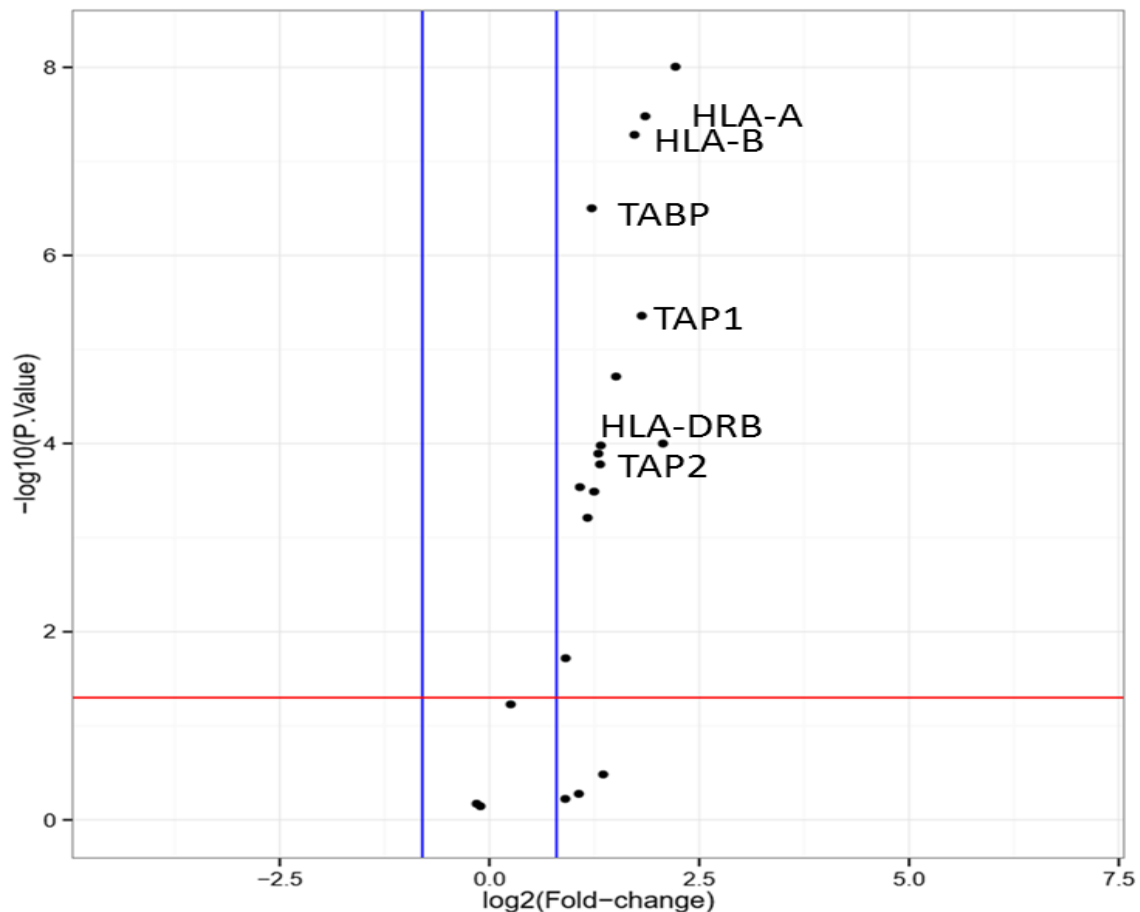


Abbildung 1: Volcano plot vermehrt exprimierte Gene de MHC1 vermittelten Antigen-Präsentation im Vergleich Tumor vs Normalgewebe

Inhibitoren der MHC-I assoziierten Phagozytose wie durch LILRB1 vermittelt, zeigten sich in auf mRNA Ebene signifikant erhöht. Auch dies stellt einen zusätzlichen Tumor Escape Mechanismus dar. ⁵²

In der Gruppe der neoadjuvant vorbehandelten EACs zeigten sich ebenfalls Unterschiede der MHC assoziierten Gene. Hier konnte eine vermehrte Expression von MHC II assoziierten Gene in der Gruppe der neoadjuvant chemotherapeutisch (FLOT) behandelten EACs im Vergleich zu der zuvor radio-chemotherapeutisch (CROSS) behandelten Tumore nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte

sich beim Vergleich dieser Gruppen eine verminderte Expression der MHC I-Komplex-assoziierten Genen wie TAP Transporter Genen TAP 1 und TAP2, so dass in der CROSS vorbehandelten Gruppe die überlebenden Tumorklone über eine Herunterregulation dieser Antigenpräsentationsfähigkeit einen Selektionsvorteil erhalten, da sie sich vermehrt dem Immunsystem entziehen können.

4.1 T-Zell Status

Die Infiltration von T-Zellen in verschiedenen Tumorentitäten und ihre Auswirkung auf den Progress der Erkrankung und das Gesamtüberleben wird seit mehreren Jahren in verschiedenen Studien untersucht. ^{53–56}

So konnte für Adenokarzinome des Kolons eine besondere prognostische Relevanz einer T-Zell reichen Invasionszone an der Grenze zwischen Tumor- und umliegenden Normalgewebe nachgewiesen werden ⁵⁴. Im Paper von Berthel et al. konnte darüber hinaus die besondere Relevanz einer weiteren Unterteilung der Invasionszone in einen inneren dem Tumor zugewandten und äußeren Bereich bewiesen werden ⁵³.

Anhand dieser Ergebnisse haben Galon et al einen sogenannten Immunoscore entwickelt, mit dessen Hilfe sich eine klinisch relevante Aussage zur Prognose treffen lässt. Bei der Ermittlung dieses Scores wird die Infiltration von zwei unterschiedlichen Lymphozyten Populationen (zumeist CD3/CD8, seltener jedoch CD3/CD45RO oder CD8/CD45RO) im Tumorzentrum und der Infiltrationszone anhand ihrer Dichte ermittelt und auf einer Skala von 0, wenn eine geringe Dichte beider Zellpopulationen in beiden Regionen vorliegt, bis 4, wenn in beiden Regionen eine hohe Dichte beider Zellpopulationen gemessen werden kann, angegeben. ⁵⁷

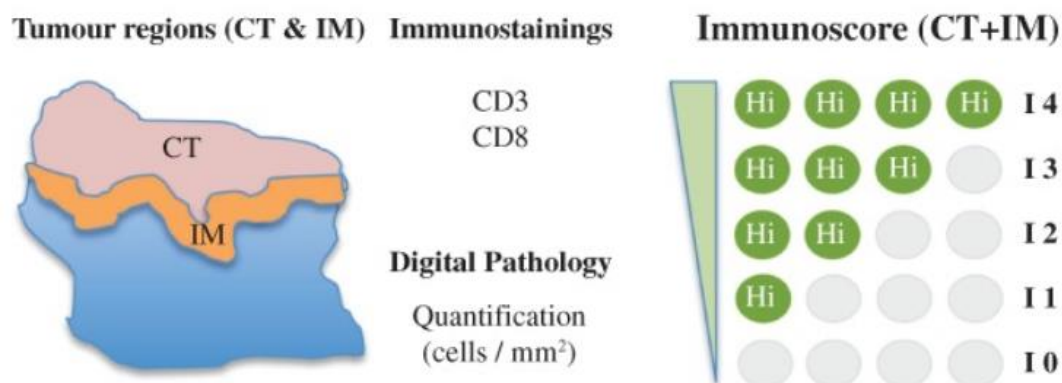


Abbildung 2 aus: Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795): 1960–1964

Für Adenokarzinome des Ösophagus, Magens und gastroösophagealen Übergang haben mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen T-Zellinflammation und Prognose untersucht. Noble et al haben nachweisen können, dass die vermehrte Infiltration von T-Zellen im Tumorzentrum mit einem besseren Outcome für EACs korreliert ⁵⁵, während Stein et al eine Signifikanz für eine T-Zellinflammation des Tumorzentrums, jedoch nicht der Invasionszone nachweisen konnten. ⁵⁶Ein möglicher limitierender Faktor beider Studien ist die Nutzung von Tissue Microarrays während unserer Studie die kompletten Tumorschnitte untersuchen.

Hier wurde erstmalig an einem großen Kollektiv lokal fortgeschrittener nicht neoadjuvant behandelter EACs die Auswirkung von T-Zellinfiltration in verschiedenen Teilen des Tumors im Hinblick auf die Prognose untersucht. Galon et al. hatten beim Kolonkarzinom zuvor bereits die herausragende prognostische Bedeutung der T-zellreichen Infiltrationszone zeigen können. Unklar ist aber über welche Ausdehnung der Infiltrationszone sich eine derartige Prognose zeigen lässt. Es gibt Hinweise, dass es nur einen sehr geringen Spielraum von wenige Mikrometer (µm) gibt, die tumorbiologisch relevant sind. Nichts ist dazu beim EAC bekannt. Wir haben ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium (ab T2) gewählt, da die Mehrzahl der Patienten mit einem EAC in diesem Stadium symptomatisch werden. Es muss aber kritisch angemerkt werden, dass die Prognose in diesem Stadium bereits häufig sehr

ungünstig ist. In wie weit in dieser prognostisch ungünstigen Betrachtungsgruppe tatsächlich noch eine Prognoserelevanz durch die T-Zellinflammation gezeigt werden kann war eine relevante Fragestellung. Mittels software-basierter Analysetechnik konnte eine präzise Unterteilung in eine 50µm dicke innere und 300 µm dicke äußere Infiltrationszone durchgeführt werden. (Abbildung 2). Ich konnte signifikante Unterschiede der T-Zellinfiltration nicht nur zwischen unterschiedlichen Tumoren sondern auch im selben Tumor nachweisen. Zwischen den verschiedenen Tumoren zeigten sich in absoluten Zahlen ausgedrückt Unterschiede von 800 bis 4.270.000 T-Zellen im Tumorzentrum sowie 60 bis 51.000 T Zellen in der Invasionszone innerhalb genormter Flächen.

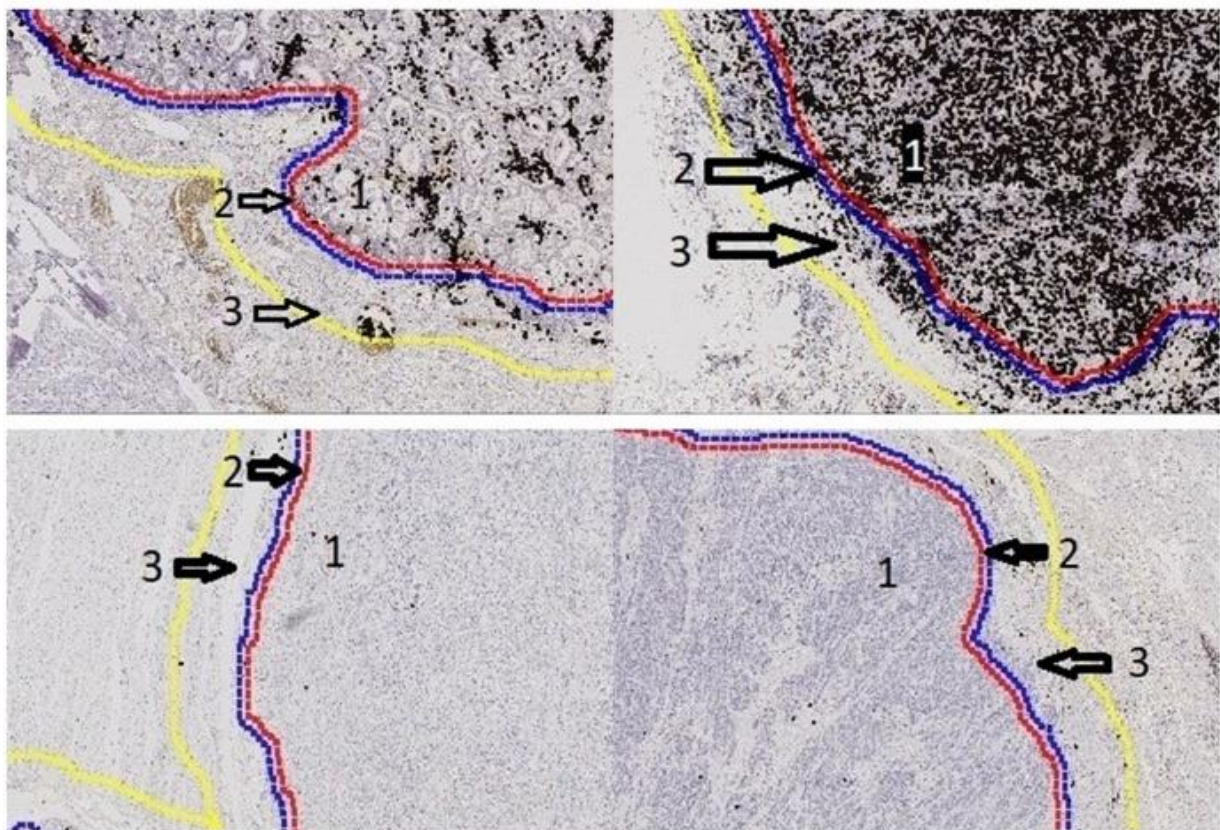


Abbildung 3: Unterteilung eines Tumorausschnitt in Tumorzentrum (1), innere (2) und äußere (3) Infiltrationszone

Dies zeigt einmal mehr wie unterschiedlich T-Zell-entzündet EACs sind. Es gibt auch beim EAC „hot tumors“ (T-zellreich) und „cold-tumors“ (T-zellarm). Alleine diese

Feststellung hat vermutlich enorme Relevanz für die zu erwartende Effizienz von PD-1 Inhibitoren wie Nivolumab oder Pembrolizumab, da davon auszugehen ist, dass diese Wirkstoffe bei „kalten Tumoren“ weniger effektiv sind, da gar keine T-Zellen vorhanden sind, die nach Wegfall von PD-1 tumordestruierend sein könnten. Die therapeutische Herausforderung wird zukünftig sein, „kalte“ Tumoren in „warme“ zu überführen, sprich die Antigenitätswahrnehmung durch das Immunsystem zu erhöhen. Es dürfte zukünftig interessant sein, dies an Tumorkollektiven wie der Checkmate 649 Studie retrospektiv zu betrachten. Ich konnte für das EAC erstmals zeigen, dass die Invasionszone deutlich weniger T-Zellinfiltration als das Tumorzentrum aufweist. Bei der detaillierter Betrachtung der T-Zellinfiltration der Invasionszone zeigte sich, dass diese in der inneren Invasionszone im Durchschnitt vier Mal niedriger war als in der äußeren Invasionszone.

Anhand unserer Kohorte konnte bei der Auswertung der Daten für die Infiltration der Invasionszonen keine prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Eine Prognoserelevanz konnten wir jedoch für die T-Zellinfiltration im Tumorzentrum zeigen. Diese Ergebnisse zeigen sich kohärent mit den Ergebnissen einer früheren Studie zu T-Zellinfiltration im Tumorzentrum von EACs mittels „tissue micro-arrays“ (TMAs).⁵⁶

Eine Kombination von stark T-Zell infiltriertem Tumorzentrum und der Invasionszone erbrachte keine zusätzlichen prognostischen Aspekte beim Adenokarzinome des Ösophagus. Dies deckt sich ebenfalls mit früheren Studien zu Adenokarzinomen des Magens.⁸

Während für Magen- oder Kolonkarzinome eine häufige Assoziation zwischen hoher T-Zell-Infiltration und Nachweis von DNA- Reparationsdefekten (z.B. Mikrosatelliteninstabilität) besteht^{58,59}, sind diese beim EACs sehr selten (circa 1%-3% der EAC sind MSI im Gegensatz zu circa 14% beim Kolon und 7-21% beim Magen). Keine EACs die wir für unsere Studien verwendet haben waren Mikrosatelliten-instabil.

So beschreibt „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) vier verschiedene Subtypen von Adenokarzinomen des Magens: 1) Epstein-Barr Virus- assoziiert (EBV), (2)

Mikrosatelliteninstabilität (MSI), (3) Chromosomale Instabilität (CIN) und (4) Genomische Stabilität (GS) ⁶⁰. In der Untersuchung von 76 EACs zeigte eine zweite Studie des TCGA dass diese zu über 90 % der Gruppe der CIN zugeordnet werden können, jedoch konnte in diesem Kollektiv kein Tumor der Gruppe des EBV- oder MSI-assoziierten zugeordnet werden. ⁶¹

Auf mRNA Ebene konnte im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe die T-Zellanreicherung gemessen an der CD3 Expression dreifach erhöht für primär resezierte Tumore jedoch nur zweifach erhöht für neoadjuvant (radio)chemotherapeutisch vorbehandelte Tumore nachgewiesen werden. Dies deutet bereits an, dass die Neoadjuvanz Auswirkungen auf die zumindest lokale Zusammensetzung des inflammatorischen Mikroenvironments hat. Ich möchte diesen Aspekt nun weiter vertiefen. ⁶²

4.2 Expression verschiedener Immuncheckpoints

In unserer Studie wurde die Genexpression verschiedener Immuncheckpoints untersucht. Hier zeigte sich unter anderem die Expression von CTLA-4 in Tumorgewebe 3,5-4-fach im Vergleich zum Normalgewebe erhöht. CTLA-4 hemmt die Aktivierung von T-Zellen und erlaubt dem Tumor einer Antwort des adaptiven Immunsystems zu entkommen.⁶³

Die Expression von PD-L1 zeigte sich im Vergleich zum normalen Gewebe in allen Tumoren schwach erhöht, PD-1 eine bis 3-fache Erhöhung. Die neoadjuvante Chemotherapie hatte keinen messbaren Effekt auf die Expression von PD-L1 oder PD-1.

Neben CTLA-4 und PD-1/PD-L1 sind weitere Immun-Checkpoints in präklinischen Studien von Interesse, welche potentielle Antikörpertherapien erforschen. Zu nennen sind hier unter anderem LAG3 und HavCR2 (TIM-3). TIM-3 zeigte sich in unserer Kohorte ebenfalls 3-fach erhöht unabhängig von neoadjuvanter Vorbehandlung.

LAG3 zeigte eine 4-fache Überexpression in primär resezierten und eine 2-fache Erhöhung in neoadjuvant vorbehandelten Tumoren.

Andere Studien haben bereits molekulare Subtypen identifiziert, die mit verbessertem klinischem „outcome“ nach Immuntherapie assoziiert sind. So wurden zum Beispiel für kolorektale Karzinome aber auch für Karzinome des oberen GI-Traktes definiert die mikrosatelliten-instabilen Tumoren als besonders sensitiv für Immuntherapie definiert.^{46,47,64,65}

Der Consensus molecular subtype I (CSM I) für Kolorektale Karzinome ist durch eine hohe Expression von PD-1, CTLA-4, IDO1 und andere Immun Checkpoints charakterisiert. Seine Immunregulation ist vor allem durch die Chemokine CXCR3/CCR5 Achse und cytotoxische Effektor Mechanismen, welche von kritischer Bedeutung für die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen sind, gesteuert.

In unserer Studie zeigte sich, dass nicht-neoadjuvant vorbehandelte Patienten mit EAC ebenfalls eine hohe Expression von mehreren Immun-Checkpoints sowie eine

Hochregulation der CXCR3/CCR5 Achse zeigten. Hier könnte eine Definition verschiedener prognostischen Phänotypen mit Empfehlung potentieller therapeutischer Strategien Anknüpfungspunkte für weitere Forschung bilden.

Zudem konnten wir eine Untergruppe in unserer Kohorte identifizieren welche eine besonders hohe Expression von „cancer testis antigens (CTAs)“ zeigten. Diese Antigene werden physiologisch nur in Keimzellen nicht aber in anderen adulten Geweben exprimiert. Die Expression der CTAs durch die Tumorzellen stellt somit ein mögliches relevantes Erkennungsmerkmal für das Immunsystem dar. Die Tumore dieser Gruppe zeigte zudem eine signifikante Überexpression von Genen, die mit Tumorprogression und Metastasierung einhergehen wie die Mitglieder der MAGE-A und CAGE12 Familie.^{66,67} Ein Score der Expression von CTAs könnte demnach einen möglichen prognostischen Marker für das klinische Outcome von Patientinnen und Patienten mit EAC bilden, wie es schon in anderen Tumorentitäten beschrieben wird.⁶⁸

Im Gegensatz zu älteren Studien zur PD-1 Expression konnte in unserer Studie kein signifikanter Unterschied der PD-1 Expression für primär resezierte und neoadjuvant vorbehandelte Tumore beobachtet werden.

Insgesamt wurde in unserer Kohorte PD-1 und PD-L1 wenig exprimiert. Die bereits erwähnte aktuelle Checkmate 649 Studie zeigt jedoch ein gutes Ansprechen für einen kleinen Anteil von EACs auf Nivolumab, sodass diese Wirkstoffgruppe in Zukunft auch für diese Tumorentität Anwendung finden wird. Besonders effektiv ist die Blockade für Tumore mit einem combined positive score (CPS) von 5 oder mehr. Hierbei wird immunhistochemisch der PD-L1 Gehalt auf Tumor und Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten ermittelt und mit der Anzahl an allen Zellen verrechnet.

Auch Tumore mit einem geringeren CPS zeigten in dieser Studie ein Ansprechen auf Nivolumab auch wenn der Effekt, gemessen am Gesamtüberleben, in dieser Kohorte geringer ausfiel.

Andere Checkpoint Moleküle wie HAVCR2 (TIM-3), LAG-3 und CTLA-4 wurden in den untersuchten Tumorproben stark überreguliert und könnten mögliche weitere Ansatzpunkte für Immuntherapie darstellen. (s Abbildung 3)

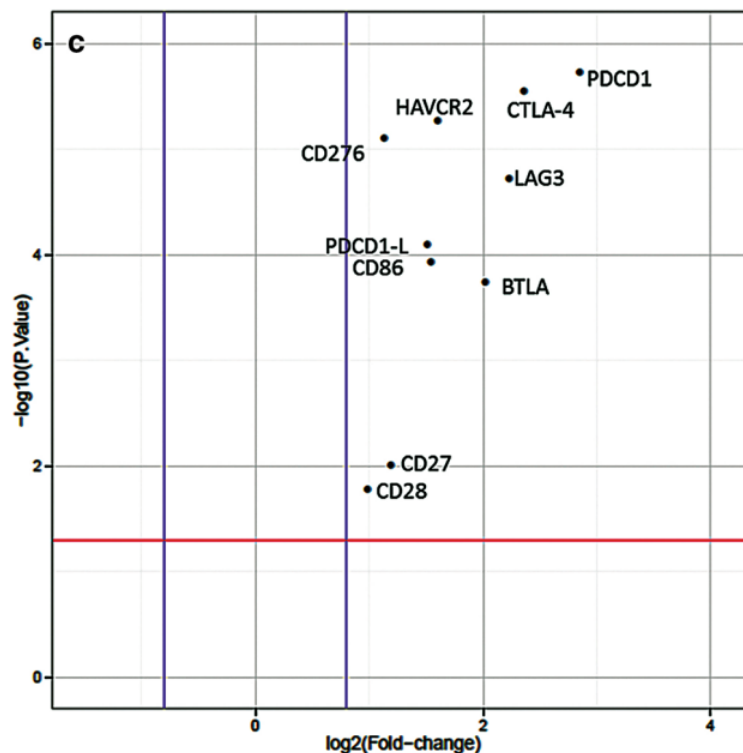


Abbildung 4: Expression von Immun Checkpoint Genen im Vergleich primär resezierte EACs vs Normalgewebe

Ein weiterer derzeit stark diskutierte Faktor ist die hohe Tumormutationslast (tumor mutational burden), welche in den meisten EACs nachgewiesen werden konnte ⁶⁹ und mit einem potentiellen Erfolg einer Therapie mit PD1-Inhibitoren korrelieren könnte. Dies ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. ⁷⁰

CD276 (B7-H3) ist ein Gen, welches mit PD-1 assoziiert ist und ähnliche inhibitorische Effekte auf T-Zellen induziert. Zusätzlich vermittelt CD276 eine inhibitorische Wirkung auf die Ausschüttung von IFN- γ , TNF- α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen ⁷¹ und bildet damit eine weitere Möglichkeit des Tumors zur Abschwächung einer anti-tumoralen Immunreaktion.

Wir konnten CD276 ebenfalls deutlich hochreguliert in primär resezierten EACs nachweisen.

4.3 Die „Tumor inflammation signature“

Wie oben ausgeführt, entkommen Tumoren mit noch ausreichend hoher Antigenpräsentation einer Erkennung durch das Immunsystem durch eine vermehrte Expression lokal in der Tumorumgebung wirksamer Immun-inhibitorischen Molekülen (Rezeptoren und Liganden) wie PD-1/PD-L1, LAG3, HAVCR2 (TIM-3).³³ Dies ein wichtiger escape Mechanismus.⁷² Um die Effizienz von Immuntherapie zu steigern müssen möglichst viele Escape- Mechanismen beachtet werden., Dies kann durch Erstellen eines Immunprofils erreicht werden.

Interessanterweise zeigten sich in unserer Kohorte der primär resezierten EACs bestimmte Immun Escape Mechanismen dominant während andere kaum vorhanden waren.

Der am deutlichsten hervorzuhebende Mechanismus war die Expression von CheckpointInhibitoren wie CTLA-4, HAVCR3 (TIM-3) und LAG3 (deutlich höher als PD-L1/PD-1).

Die sogenannte „tumor inflammation signature (TIS)“, eine von Merck und Nanostring entwickelte Signatur von 18 Genen, welche mit einer verminderten Immunantwort in Tumoren assoziiert ist bezieht beide o.g. Immun escape Mechanismen mit ein. Eine erhöhte Expression dieser Gene geht mit einem besseren Ansprechen auf PD-L1 Blockade einher.⁷³ Eine deutlich erhöhte TIS zeigte sich in unserer Kohorte bei fast allen Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe. Ungefähr 50% der Proben zeigten einen besonders hohen TIS-Score.

Des Weiteren konnte eine hohe Expression von CD38 in den nicht neoadjuvant vorbehandelten EACs nachgewiesen werden. CD38 wird durch die CD8+-T-Zellen des Tumormikromilieus beeinflusst und korreliert ebenfalls mit der TIS⁷⁴. Auch in unserer Kohorte konnte wir eine starke positive Korrelation zwischen der TIS und der CD38 Expression nachweisen. (Abbildung 4)

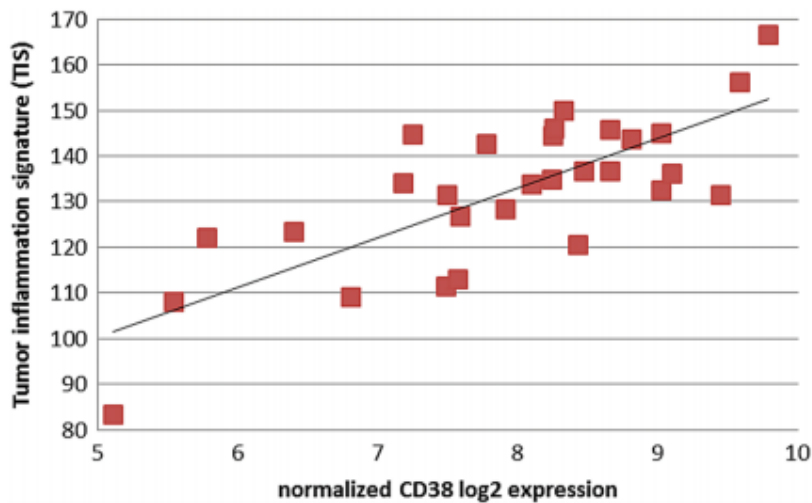


Abbildung 5: Korrelation der CD 38 Expression mit der Tumor Inflammation Signature (TIS). Der Korrelationskoeffizient $r = 0,86$ zeigt eine starke Korrelation zwischen der Expression von CD38 und dem durch die TIS definierten Phänotyp

Eine besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Immun Checkpoints Inhibitoren könnte damit für EACs mit einer hohen TIS kombiniert mit erhöhter CD8 und CD38 Expression durch eine Kombination mit anti-CD38 Antikörpern erreicht werden, wie es in Tiermodellen bei Lungenkrebs schon untersucht wurde.⁷⁵

Für Patientinnen und Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie geht eine erhöhte Expression von CD38 mit einer schlechteren Prognose einher.⁷⁶

Der anti-CD38 Antikörper „Daratumumab“ konnte nachgewiesenermaßen eine Apoptose der betroffenen Zellen erreichen.⁷⁷ Eine Kombination von Daratumumab und PD-L1/PD-1 Checkpoint Inhibitoren könnte somit eine Verbesserung des Outcomes für Patientinnen und Patienten mit EAC bewirken und ein interessanter Punkt weiterer klinischer Studien sein.

4.4 Der Einfluss von neoadjuvanter (Radio)chemotherapie auf das Immunprofil

Neoadjuvante (Radio)chemotherapie ist inzwischen eine etablierte first-line Therapie für operable Karzinome des Ösophagus.^{20,21} Wir konnten nach Neoadjuvanz eine signifikant geringere T-Zell Expression (gemessen an CD3 und CD8) feststellen. Dies impliziert, dass eine neoadjuvante Therapie die Aktivität der Lymphozyten und andere Komponenten der adaptiven Immunantwort, welche als Ansatzpunkte von Immuntherapie dienen könnten, abschwächt.

Da die Komposition des lokalen „*tumor microenvironments*“ einen der wichtigsten Faktoren der Effizienz von Immuntherapie bildet^{62,78} sollte eine Kombination von neoadjuvante Radio Chemotherapie in Kombination mit Immuntherapie zurückhaltend eingesetzt werden, wobei ähnliche Beobachtungen auch für Patienten mit Cervixkarzinom und Kolorektalem Karzinom gemacht werden konnten.^{62,79}

Allerdings wird die Theorie diskutiert, dass die neoadjuvante (Radio)-chemotherapie durch die plötzliche Destruktion von Tumorzellen zu einem massenhaften Freisetzen von (mutierten) Fremproteinen führt, das zu einer starken Neoantigenerkennung durch das Immunsystem beiträgt. Diese durch die Neoadjuvanz induzierte Neoantigenerkennung könnte durch memory-T-Zellen einen anti-tumoralen systemischen Effekt ausüben. Demnach ist der durch uns nachgewiesene lokale Effekt auf das Tumormikroenvironment möglicherweise relativiert. Auch dies ist Gegenstand aktueller Studien. In der aktuell rekrutierenden Rice-Studie wird die Relevanz einer kombinatorischen Effektivität aus einem PD-L1 Inhibitor mit Radio-Chemotherapie in der Neoadjuvanz untersucht.⁸⁰ [83]

Ein limitierender Faktor unsere Studie ist die geringe Anzahl (n=17) an EACs, welche neoadjuvant vorbehandelt wurden. Zudem muss auch beachtet werden, dass sich diese nochmals in zwei unterschiedliche Therapieregime (FLOT vs. CROSS) unterscheiden.

Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich zwar eine deutliche Hochregulation von MHC II Klasse Molekülen und Faktoren der B-Zell Aktivierung für nach FLOT Schema im Vergleich zum CROSS Schema. (s. Abbildung 5)

Jedoch fällt auch eine deutliche Konsistenz der Tumoren beider Schemata auf: Gene fast aller wichtiger Checkpoint Marken und Inflammations-assoziierten Gene des lokalen Mikroenvironment sind in beiden Sub-Gruppen deutlich weniger exprimiert als in primär resezierten Tumoren. Ob dieser lokale Effekt negative Auswirkungen auf die Effektivität einer Checkpoint-Inhibition tatsächlich hat wird aber zu diesem Zeitpunkt, wie oben ausgeführt, untersucht.

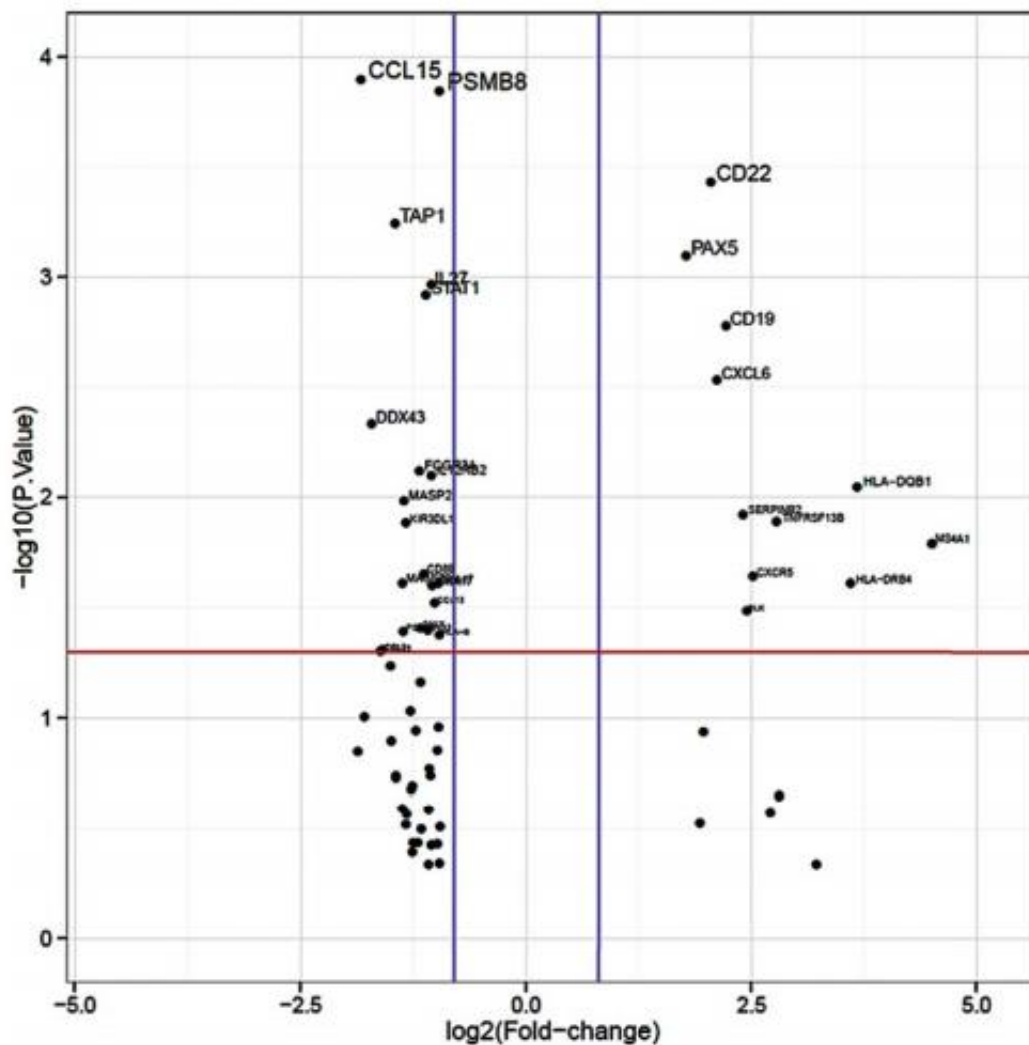


Abbildung 6: Volcano Plot der unterschiedlich exprimierte Gene der FLOT vs CROSS vorbehandelten Tumore

4.5 Mögliche neue therapeutische Ansätze für EACs

Da unsere Studie eine überraschend höhere Expression der Checkpoint Marker LAG3, TIM-3, CTLA4 und CD276 im Gegensatz zu PD-L1/PD-1 in EACs zeigte könnten sich hier mögliche, vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige Therapien bieten.

Vor allem TIM-3 (HAVCR2) könnte ein interessanter und vielversprechender Ansatzpunkt von Immuntherapie darstellen, da es auf eine Vielzahl von T-Zellen Dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird und eine starke Immunantwort hervorruft.⁸¹

Auch LAG-3 als weiterer vielversprechender Immun-Checkpoint konnte in verschiedenen klinischen Studien als Kombination mit anti-PD1 Therapie als möglicher Ansatzpunkt für eine Kombinationstherapie dienen.⁸²

PD-1, TIM-3 und LAG-3 Inhibitoren können eine T-Zell vermittelte Immunantwort auf Antigene eines Tumors steigern. Die synergistische Funktion der hier aufgezählten Inhibitoren könnte zudem die Effektivität derartiger kombinatorischer Therapien steigern.⁸³

5. Literaturverzeichnis

- 1 Edgren G, Adami H-O, Weiderpass E, Weiderpass Vainio E, Nyrén O. A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic. *Gut* 2013; **62**: 1406–14. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302412>.
- 2 Gavin AT, Francisci S, Foschi R, et al. Oesophageal cancer survival in Europe: a EURO-CARE-4 study. *Cancer Epidemiol* 2012; **36**: 505–12. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.07.009>.
- 3 Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin* 2013; **63**: 232–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21185>.
- 4 Naveed M, Kubiliun N. Endoscopic Treatment of Early-Stage Esophageal Cancer. *Curr Oncol Rep* 2018; **20**. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0713-y>.
- 5 Kapoor H, Agrawal DK, Mittal SK. Barrett's esophagus: recent insights into pathogenesis and cellular ontogeny. *Transl Res* 2015; **166**: 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.009>.
- 6 Zentrum für Krebsregisterdaten Deutschland. Zentrum für Krebsregisterdaten Deutschland (2017),. www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Speiserohrenkrebs/speiserohrenkrebs_node.htm.
- 7 Bareiss D, Stabenow R, Müller R, et al. Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; **127**: 1367–74. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32375>.
- 8 Pernot S, Terme M, Radošević-Robin N, et al. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. *Gastric Cancer* 2020; **23**: 73–81. <https://doi.org/10.1007/s10120-019-00983-3>.
- 9 Pohl H, Wrobel K, Bojarski C, et al. Risk factors in the development of esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2013; **108**: 200–07. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.387>.
- 10 Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2241–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMr035010>.
- 11 Gronnier C, Tréchet B, Duhamel A, et al. Impact of neoadjuvant chemoradiotherapy on postoperative outcomes after esophageal cancer resection: results of a European multicenter study. *Ann Surg* 2014; **260**: 764-70; discussion 770-1. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000955>.
- 12 Lagergren P, Avery KNL, Hughes R, et al. Health-related quality of life among patients cured by surgery for esophageal cancer. *Cancer* 2007; **110**: 686–93. <https://doi.org/10.1002/cncr.22833>.
- 13 Castellsagué X, Muñoz N, Stefani E de, et al. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer* 1999; **82**: 657–64. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990827\)82:5<657::aid-ijc7>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990827)82:5<657::aid-ijc7>3.0.co;2-c).

- 14 Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; **83**: 2049–53.
- 15 Deutsche Krebsgesellschaft DK. Leitlinienprogramm Onkologie): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adeno- karzinome des Ösophagus, Langversion 2.0. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/oesophaguskarzi->.
- 16 Liu L, Hofstetter WL, Rashid A, et al. Significance of the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in superficially invasive (T1) esophageal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**: 1079–85.
- 17 Nigro JJ, Hagen JA, DeMeester TR, et al. Prevalence and location of nodal metastases in distal esophageal adenocarcinoma confined to the wall: implications for therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **117**: 16-23; discussion 23-5. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(99\)70464-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(99)70464-2).
- 18 Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; **345**: 725–30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010187>.
- 19 Patel AN, Preskitt JT, Kuhn JA, Hebel RF, Wood RE, Urschel HC. Surgical management of esophageal carcinoma. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2003; **16**: 280–84. <https://doi.org/10.1080/08998280.2003.11927914>.
- 20 Herskovic A, Martz K, al-Sarraf M, et al. Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1992; **326**: 1593–98. <https://doi.org/10.1056/NEJM199206113262403>.
- 21 Gebski V, Burmeister B, Smithers BM, Foo K, Zalcborg J, Simes J. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007; **8**: 226–34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70039-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70039-6).
- 22 Chan KKW, Saluja R, Delos Santos K, et al. Neoadjuvant treatments for locally advanced, resectable esophageal cancer: A network meta-analysis. *Int. J. Cancer* 2018; **143**: 430–37. <https://doi.org/10.1002/ijc.31312>.
- 23 Al-Batran S-E, Homann N, Pauligk C, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 2019; **393**: 1948–57. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32557-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32557-1).
- 24 Al-Batran S-E, Hofheinz RD, Pauligk C, et al. Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the

- phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 1697–708. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30531-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30531-9).
- 25 Shouji Shimoyama. Definitive Chemo-Radiotherapy for Resectable Esophageal Cancer — Unresolved Problems Remain. 9. In: Letícia Rangel, ed. *Cancer Treatment*. Rijeka: IntechOpen, 2013.
 - 26 Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021; **398**: 27–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00797-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00797-2).
 - 27 Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned.Tijdschr.Geneeskd*.5(Part 1):, 1909.
 - 28 Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 329–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
 - 29 Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 948501. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>.
 - 30 Neagu M. The Immune System—A Hidden Treasure for Biomarker Discovery in Cutaneous Melanoma. In: *Advances in Clinical Chemistry Volume 58*. Elsevier, 2012: 89–140.
 - 31 Teixeira L, Rothé F, Ignatiadis M, Sotiriou C. Breast Cancer Immunology. *Oncology Times* 2016: 18–19.
 - 32 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
 - 33 Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 687–92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860>.
 - 34 Leone P, Shin E-C, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013; **105**: 1172–87. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt184>.
 - 35 Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; **331**: 1565–70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
 - 36 Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; **6**: 315–25. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80334-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80334-9).
 - 37 Thomas GR, Chen Z, Leukinova E, van Waes C, Wen J. Cytokines IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF constitutively secreted by oral squamous carcinoma induce down-regulation of CD80 costimulatory molecule expression: restoration by interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53**: 33–40. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0433-4>.

- 38 Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 852–63. <https://doi.org/10.1038/nri3108>.
- 39 Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Adv Exp Med Biol* 2020; **1248**: 33–59. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_3.
- 40 Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020; **10**: 727–42.
- 41 Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1627–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>.
- 42 Ferris RL, Blumenschein G, JR, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016; **375**: 1856–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>.
- 43 Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1803–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510665>.
- 44 Bockorny B, Pectasides E. The emerging role of immunotherapy in gastric and esophageal adenocarcinoma. *Future Oncol* 2016; **12**: 1833–46. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0103>.
- 45 Vrána D, Matzenauer M, Melichar B. Current Status of Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Esophageal and Gastric Tumors - Overview of Studies. *Klin Onkol* 2017; **31**: 35–39. <https://doi.org/10.14735/amko201835>.
- 46 Shitara K, Özgüroğlu M, Bang Y-J, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2018; **392**: 123–33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31257-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31257-1).
- 47 Shitara K, van Cutsem E, Bang Y-J, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer: The KEYNOTE-062 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2020; **6**: 1571–80. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.3370>.
- 48 Lin C-F, Lin C-M, Lee K-Y, et al. Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci* 2017; **24**: 10. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0317-0>.
- 49 Rodríguez JA. HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncol Lett* 2017; **14**: 4415–27. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6784>.
- 50 Campoli M, Chang C-C, Ferrone S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 2002; **20 Suppl 4**: A40-5. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00386-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00386-9).
- 51 Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen

- expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; **71**: 142–47.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970410\)71:2<142::aid-ijc3>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970410)71:2<142::aid-ijc3>3.0.co;2-0).
- 52 Barkal AA, Weiskopf K, Kao KS, et al. Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 2018; **19**: 76–84. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0004-z>.
 - 53 Berthel A, Zoernig I, Valous NA, et al. Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncol Immunology* 2017; **6**: e1286436.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1286436>.
 - 54 Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; **313**: 1960–64. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
 - 55 Noble F, Mellows T, McCormick Matthews LH, et al. Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2016; **65**: 651–62.
<https://doi.org/10.1007/s00262-016-1826-5>.
 - 56 Stein AV, Dislich B, Blank A, et al. High intratumoural but not peritumoural inflammatory host response is associated with better prognosis in primary resected oesophageal adenocarcinomas. *Pathology* 2017; **49**: 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.005>.
 - 57 Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 2014; **232**: 199–209. <https://doi.org/10.1002/path.4287>.
 - 58 Kang BW, Kim JG, Lee IH, Bae HI, Seo AN. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes for gastric cancer in the era of immunology. *WJGO* 2017; **9**: 293. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v9.i7.293>.
 - 59 Richards CH, Roxburgh CS, Powell AG, Foulis AK, Horgan PG, McMillan DC. The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 2014; **50**: 309–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.09.008>.
 - 60 Cancer Genome Atlas Research N, Analysis Working Group: Asan U, Agency BCC, Brigham, Women's H, Broad I, Brown U, Case Western Reserve U, Dana-Farber Cancer I, Duke U, Greater Poland Cancer C, Harvard Medical S, Institute for Systems B, Leuven KU, Mayo C, Memorial Sloan Kettering Cancer C, National Cancer I, Nationwide Children's H, Stanford U, University of A, University of M, University of North C, University of P, University of R, University of Southern C, University of Texas MDACC, University of W, Van Andel Research I, Vanderbilt U, Washington U, Genome Sequencing Center: Broad I, Washington University in St L, Genome Characterization Centers BCCA, Broad I, Harvard Medical S, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins U, University of North C, University of Southern California Epigenome C, University of Texas MDACC, Van Andel Research I, Genome Data Analysis Centers: Broad I, Brown U, Harvard Medical S, Institute for Systems B, Memorial Sloan Kettering Cancer C,

University of California Santa C, University of Texas MDACC, Biospecimen Core Resource: International Genomics C, Research Institute at Nationwide Children's H, Tissue Source Sites: Analytic Biologic S, Asan Medical C, Asterand B, Barretos Cancer H, Bioreclamationlvt, Botkin Municipal C, Chonnam National University Medical S, Christiana Care Health S, Cureline, Duke U, Emory U, Erasmus U, Indiana University Clinical and Translational Oncology 1 3 School of M, Institute of Oncology of M, International Genomics C, Invidumed, Israelitisches Krankenhaus H, Keimyung University School of M, Memorial Sloan Kettering Cancer C, National Cancer Center G, Ontario Tumour B, Peter MacCallum Cancer C, Pusan National University Medical S, Ribeiro Preto Medical S, St. Joseph's H, Medical C, St. Petersburg Academic U, Tayside Tissue B, University of D, University of Kansas Medical C, University of M, University of North Carolina at Chapel H, University of Pittsburgh School of M, University of Texas MDACC, Disease Working Group: Duke U, Memorial Sloan Kettering Cancer C, National Cancer I, University of Texas MDACC, Yonsei University College of M, Data Coordination Center CI, Project Team: National Institutes of H. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature* 2017; **541**: 169–75. <https://doi.org/10.1038/nature20805>.

- 61 Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; **513**: 202–09. <https://doi.org/10.1038/nature13480>.
- 62 Jarosch A, Sommer U, Bogner A, et al. Neoadjuvant radiochemotherapy decreases the total amount of tumor infiltrating lymphocytes, but increases the number of CD8+/Granzyme B+ (GrzB) cytotoxic T-cells in rectal cancer. *Oncolmmunology* 2018; **7**: e1393133. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1393133>.
- 63 Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 2018; **131**: 58–67. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741033>.
- 64 André T, Shiu K-K, Kim TW, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2207–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2017699>.
- 65 Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* 2018; **362**: k3529. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3529>.
- 66 Craig AJ, Garcia-Lezana T, Ruiz de Galarreta M, et al. Transcriptomic characterization of cancer-testis antigens identifies MAGEA3 as a driver of tumor progression in hepatocellular carcinoma. *PLoS Genet* 2021; **17**: e1009589-e1009589. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009589>.
- 67 Lee EK, Song K-A, Chae J-H, Kim K-M, Kim S-H, Kang M-S. GAGE12 mediates human gastric carcinoma growth and metastasis. *Int J Cancer* 2015; **136**: 2284–92. <https://doi.org/10.1002/ijc.29286>.

- 68 Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* 2015; **6**: 15772–87.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4694>.
- 69 Liu Z, Liu L, Jiao D, et al. Association of RYR2 Mutation With Tumor Mutation Burden, Prognosis, and Antitumor Immunity in Patients With Esophageal Adenocarcinoma. *Front. Genet.* 2021; **12**.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.669694>.
- 70 Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med* 2017; **377**: 2500–01.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1713444>.
- 71 Castellanos JR, Purvis IJ, Labak CM, et al. B7-H3 role in the immune landscape of cancer. *Am J Clin Exp Immunol* 2017; **6**: 66–75.
- 72 Gajewski TF, Woo S-R, Zha Y, et al. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 2013; **25**: 268–76. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.02.009>.
- 73 Danaher P, Warren S, Lu R, et al. Pan-cancer adaptive immune resistance as defined by the Tumor Inflammation Signature (TIS): results from The Cancer Genome Atlas (TCGA). *J Immunother Cancer* 2018; **6**: 63.
<https://doi.org/10.1186/s40425-018-0367-1>.
- 74 Chen L, Diao L, Yang Y, et al. CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Discov* 2018; **8**: 1156–75. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1033>.
- 75 Chen L, Li Y, Yi X, Gibbons DL. Targeting CD38 to improve anti-PD-1/CTLA-4 combination therapy in lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2018; **36**: 144.
https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.5_suppl.144.
- 76 Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 181–86.
<https://doi.org/10.1182/blood.v98.1.181>.
- 77 Manna A, Lewis-Tuffin LJ, Ailawadhi S, Chanan-Khan AA, Paulus A. Using anti-CD38 immunotherapy to enhance anti-tumor T-cell immunity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *The Journal of Immunology* 2018; **200**: 58.17-58.17.
- 78 Tang H, Qiao J, Fu Y-X. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett* 2016; **370**: 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.009>.
- 79 van Meir H, Nout RA, Welters MJP, et al. Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. *Oncol Immunology* 2016; **6**: e1267095-e1267095.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1267095>.
- 80 Brown JS, Sundar R, Lopez J. Combining DNA damaging therapeutics with immunotherapy: more haste, less speed. *Br J Cancer* 2018; **118**: 312–24.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2017.376>.
- 81 He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther* 2018; **11**: 7005–09.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S170385>.

- 82 Long L, Zhang X, Chen F, et al. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer* 2018; **9**: 176–89. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.180>.
- 83 Marcq E, Waele J de, van Audenaerde J, et al. Abundant expression of TIM-3, LAG-3, PD-1 and PD-L1 as immunotherapy checkpoint targets in effusions of mesothelioma patients. *Oncotarget* 2017; **8**: 89722–35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21113>.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Volcano plot vermehrt exprimierter Gene de MHC1 vermittelten Antigen- Präsentation im Vergleich Tumor vs Normalgewebe (S.55)

Abbildung 2: Skizierung des Immunoscores aus: *Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 313(5795): 1960–1964* (S.56)

Abbildung 3: Unterteilung eines Tumorausschnitt in Tumorzentrum (1), innere (2) und äußere (3) Infiltrationszone (S. 59)

Abbildung 4: Expression von Immun Checkpoint Genen im Vergleich primär resezierte EACs vs Normalgewebe (S. 62)

Abbildung 5: Korrelation der CD 38 Expression mit der Tumor Inflammation Signature (TIS). Der Korrelationskoeffizient $r = 0,86$ zeigt eine starke Korrelation zwischen der Expression von CD38 und dem durch die TIS definierten Phänotyp (S.64)

Abbildung 6: Volcano Plot der unterschiedlich exprimierte Gene der FLOT vs CROSS vorbehandelten Tumore (S.66)

