Aus der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck Direktor: Univ. Prof. Dr. med. T. Keck

Untersuchung der Expressionsprofile eines immuno-onkologischen Markerpanels auf Protein- und RNA-Ebene beim Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs Typ II mittels der neuen Methode des Digital Spatial Profiling

> Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck - Aus der Sektion Medizin -

> > vorgelegt von Schilah Ranjbaryan aus Hamburg

> > > Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Richard Hummel

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med Jan Löhler

Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2022 Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.08.2022 -Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1 -
1 EINLEITUNG	3 -
1.1 Anatomie der Speiseröhre und des Magens	3 -
1.1.1 Makroskopische Anatomie	3 -
1.1.2 Mikroskopische Anatomie	4 -
1.2 Das Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs	5 -
1.2.1 Epidemiologie	5 -
1.2.2 Ätiologie, Risikofaktoren	5 -
1.2.3 Klinik und Diagnostik	7 -
1.2.4 Definition, Klassifizierung	7 -
1.3 Therapie	11 -
1.3.1 Endoskopische Behandlung	12 -
1.3.2 Chirurgische Resektion	12 -
1.3.3 Perioperative Chemotherapie	14 -
1.3.4 Palliative Therapie	15 -
1.4 Immunmodulatorische Therapie	15 -
1.4.1 PD-L1	16 -
1.4.2 CTLA4	16 -
1.4.3 HER2	17 -
1.4.4 VEGF und VEGFR	18 -
1.5. Die Tumor-Stroma-Interaktion in Bezug auf die Genexpressionen	19 -
1.6 Die Proteinbiosynthese	22 -
1.7 Die histopathologische Untersuchung	24 -
1.8 Ziel der Studie	25 -
2 METHODEN	26 -
2.1 Auswahl der Patienten, klinische Datenerhebung	26 -
2.2 Patientenproben	28 -
2.2.1 Tissue-Microarray	28 -
2.2.2 GeoMx® Digital Spatial Profiling	28 -
2.3 Auswertung und Statistik	35 -

3 ERGEBNISSE 37 -
3.1 Region-of-Interest 37 -
3.2 Vergleichbarkeit der generellen Expressionsprofile von untersuchten
Markern auf Protein- und RNA-Ebene 38 -
3.3 Untersuchung der Expressionsprofile der immuno-onkologischen
Marker auf Protein- und RNA-Ebene bei Patienten ohne
neoadjuvante Vorbehandlung 40 -
3.4 Untersuchung der Expressionsprofile der immuno-onkologischen
Marker auf Protein- und RNA-Ebene bei Patienten mit neoadjuvanter
Vorbehandlung 51 -
3.5 Intratumorale Vergleichbarkeit der Expressionsprofile auf Protein- und
RNA-Ebene innerhalb eines Präparates im Tumor und Stroma 61 -
3.5.1 Vergleichbarkeit der Expressionsprofile innerhalb eines Präparates
auf Protein-Ebene im Tumor- und Stromagewebe
3.5.2 Vergleichbarkeit der Expressionsprofile innerhalb eines Präparates
auf RNA-Ebene im Tumor- und Stromagewebe
3.6 Korrelation der immuno-onkologischen Marker mit klinischen Daten 65 -
4 DISKUSSION 67 -
4.4. Maandajah kanya kanya manang kanya sa
4.1 Vergleichbarkeit der generellen Expressionsprofile der untersuchten
Marker auf Protein- und RNA-Ebene
4.2 Ontersuchung der Expressionsprome der immuno-onkologischen
marker au Flotein- und KNA-Ebene bei Fatienten onne
4.3 Untersuchung der Expressionsprofile der immune enkelegischen
4.5 Offici suchung der Expressionspronie der infinduto-officiologischen
Vorbohandlung 76
4.4 Intratumorale Vergleichbarkeit der Expressionsprofile auf Protein- und
PNA-Ebene innerhalb eines Pränarates im Tumor und Stroma
4.5 Korrelation der immuno-onkologischen Marker mit klinischen Daten _ 84 -
4.6 Limitation der Arbeit _ 25 -
4 7 7usammenfassung - 85 -
LITERATURVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	116 -
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118 -
Danksagung	120 -

Meinen Eltern und Schwestern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

# Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5- Fluoro-Uracil		
Α.	Arteria, lat. für Arterie		
Abb.	Abbildung		
AEG	Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs		
ca.	circa		
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor		
СТ	Computertomografie		
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associates protein 4		
ECF	Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil		
ECX	Epirubicin, Cisplatin und Capecitabin		
EMR	endoskopische Mukosaresektion		
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule		
ESD	endoskopischen Submukosadissektion		
EUS	Endosonographie		
GERD	gastroösophageale Refluxkrankheit		
GEJ	gastroesophageal junction		
GZMB	Granzym B		
HPLC	high performance liquid chromatography, eng. für: Hoch-		
	leistungsflüssigkeitschromatographie		
ICOS	inducible T cell co-stimulator		
IFN	Interferon		
IHC	Immunhistochemie		
IL	Interleukin		
ISH	In-situ-Hybridisierung		
log	Logarithmus		
M1-Makrophage	pro-inflammatorischer Makrophagen-Phänotyp		
M2-Makrophage	anti-inflammatorischer Makrophagen-Phänotyp		
N., Nn	Nervus, Nervi, lat. für Nerv, Nerven		
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie		
PCA	principal component analysis, eng. für:		
	Hauptkomponentanalyse		

PD-L1	Programmed Death Ligand 1		
PDK-1	Phosphoinositide-Dependent Kinase-1		
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1		
PE	Probeexzision		
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat		
ROI	Region-of-Interest, eng. für: Bereich von Interesse		
SDH	Succinat-Dyhydrogenase		
Tab.	Tabelle		
TCGA	The Cancer Genome Atlas		
TCR	T cell receptor engl. für T-Zell-Rezeptor		
TGF	transforming growth factor		
Tim-3	T-Zell-Immunglobulin-Muzin-3		
TMA	Tissue-Microarray		
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle		
TNM	Tumor (T); Nodus (N); Metastasen (M), Klassifikation zur		
	Einteilung bösartiger Tumoren		
UICC	Union Internationale contre le Cancer, franz. für Internationale		
	Vereinigung gegen Krebs		
u.a.	unter anderem		
V., Vv	Vena, Venae lat. für Vene, Venen		
z.B.	zum Beispiel		

# 1 Einleitung

# 1.1 Anatomie der Speiseröhre und des Magens

# 1.1.1 Makroskopische Anatomie

Der Ösophagus ist ein elastisch muskuläres Transportorgan, das ca. 25 cm lang ist. Es wird in drei Abschnitte unterteilt: Pars cervicalis, Pars thoracica und Pars abdominalis. (1) Die Pars cervicalis beginnt mit dem Ösophagusmund und setzt sich nach kaudal im Brustteil, zunächst im oberen Mediastinum und anschließend im hinteren unteren Mediastinum, fort. Im kürzesten Abschnitt mündet der Ösophagus im Magen. Aufgrund der nah beieinander liegenden Nachbarstrukturen liegen drei Engstellen vor: am Ösophagusmund, an der Aortenenge und am Zwerchfell. (2)

Der Ösophagus wird im Halsbereich arteriell über die Rr. oesophageales aus der A. thyroidea inferior versorgt. Im Brustbereich erfolgt die arterielle Versorgung aus der Pars thoracica aortae und im Bauchbereich ist die A. gastrica sinsitra für die Versorgung zuständig. Die venöse Drainage erfolgt über die Vv. oesophageales, die in die Vv. thyroideae inferiores münden. Im Brustbereich fließt das sauerstoffarme Blut in die V. azygos und in die V. hemiazygos. Anschließend gelangt das Blut über die Venenplexus des unteren Ösophagusabschnitts in die V. portae. (2)

Der Lymphabfluss findet ebenfalls in drei verschiedene Abschnitte statt. Die Lymphe der Lymphknoten der Pars cervicalis werden in die Nodi cervicales profundi abgeleitet; in der Pars thoracica erfolgt die Ableitung in die Nodi paratracheales, die Nodi tracheobronchiales superiores und inferiores, die Nodi bronchopulmonales und die Nodi mediastinales posteriores. Im abdominellen Bereich wird die Lymphe in die Nodi gastrici sinistri entlang der A. gastrica sinistra geleitet. (2)

Der Magen ist durchschnittlich 25–30 cm lang und hat unter anderem die Aufgabe, die Nahrung mittels Magensafts und Kontraktion aufzubereiten (1,2). Er liegt unter dem Zwerchfell und oberhalb des Colon transversum (2). Unterteilt wird der Magen in die Pars cardiaca, den Fundus gastricus, das Corpus gastricum und die Pars pylorica. Diese Unterteilung erfolgt fließend. Neben der Pars anterior und der Pars posterior liegen zwei Krümmungen vor: die Curvatura gastrica major, bei der es sich um den großen konvexen Rand des Magens handelt und die Curvatura gastrica minor, die den konkaven Rand des Magens bildet. (2)

Der Magen wird arteriell über die A. hepatica communis, die A. gastrica sinistra und die A. lienalis versorgt. Hierbei handelt es sich um Äste des Truncus coeliacus. Der venöse Abfluss leitet das Blut in die Vena portae und entspricht dem Verlauf der Arterien. Im Magen erfolgt der Lymphabfluss über die Nodi gastrici sinistri und dextri, die Nodi splenici, die Nodi gastrooementales und die Nodi pylorici. Am Ende fließt die Lymphe über die Nodi coeliaci in den Truncus intestinalis. (1,2)

#### 1.1.2 Mikroskopische Anatomie

Mikroskopisch lässt sich der Ösophagus in folgende Wandschichten einteilen: die Tunica mucosa, die darunter liegende Tela submucosa und die umgebende Tunica muscularis. Außen liegt die Tunica adventitia. Die Tunica mucosa besteht aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel, das einen mechanischen Schutz bildet. Der Übergang vom ösophagealen Plattenepithel in das einschichtige Zylinderepithel des Magens wird als Z-Linie bezeichnet. Die Tela submucosa besteht aus mukösen Glandulae oesophageae, die der Optimierung des Nahrungstransports dienen. Die Tunica muscularis besteht im oberen Viertel aus quergestreifter Muskulatur, in der Mitte aus quergestreifter und glatter Muskulatur und nur aus glatter Muskulatur in der unteren Hälfte. Dabei ist die innere Schicht ringförmig und die äußere Schicht längs verlaufend. Ganz außen befindet sich die Tunica adventitia, in der die Gefäße und die Nerven, die den Ösophagus innervieren, verlaufen. (1,2)

Im Magen liegt ein einschichtiges Zylinderepithel vor. Die Zellen dieses Epithels sezernieren das Muzin MUC5AC, einen zähen Schleim, sowie Bicarbonat. In Kombination mit Phospholipiden entsteht eine säureresistente hydrophobe Schutzschicht. (1)

In der Lamina propria befinden sich, abhängig von der Lage im Magen, unterschiedliche Magendrüsen. Im Mageneingang liegen die Kardiadrüsen, die Bicarbonat sezernieren. Im Fundus und im Corpus gibt es die Hauptzellen, die Pepsinogen und die Magenlipase produzieren. Außerdem kommen hier die Belegzellen vor, die Salzsäure und den Intrinsic Factor sezernieren. Die Nebenzellen produzieren Bikarbonat und die ECL-Zellen stellen Histamin her. Die Pylorusdrüsen bestehen aus Nebenzellen und enteroendokrinen Zellen, die Gastrin, Somatostatin und Serotonin sezernieren. (1)

# 1.2 Das Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs

#### 1.2.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist weltweit die zweithäufigste und das Ösophaguskarzinom die sechsthäufigste zum Tode führende maligne Erkrankung (3). Jährlich erkranken am Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs (AEG) 1,6 Millionen Menschen (4). In den USA und in Westeuropa ist die Inzidenz am höchsten (5). Zudem liegt der Altersgipfel der Erkrankung zwischen der sechsten und siebten Lebensdekade. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Erkrankung liegt bei 67 Jahren für Männer und bei 73 Jahren für Frauen. (6) Männer sind häufiger von einem AEG-Tumor betroffen (7).

# 1.2.2 Ätiologie, Risikofaktoren

Zu den größten Risikofaktoren gehören der gastroösophageale Reflux (GERD), das Rauchen sowie das Übergewicht (7).

Der primär kausale Faktor ist der gastroösophageale Reflux (7,8). Hierbei kommt es zu einem Rückfluss der Magensäure aufgrund eines nicht mehr funktionierenden Ösophagussphinkters. Daraufhin entstehen DNA-Schädigungen am ösophagealen Epithel, die zu Metaplasien führen. Dies bedeutet, dass das mehrschichtige Plattenepithel durch ein hochprismatisches Zylinderepithel ersetzt wird. Es entsteht ein sogenannter Barrett-Ösophagus, den ca. 5–10 % aller GERD-Patienten entwickeln. (8) Allerdings liegt nur bei 50 % aller Patienten mit einem Barrett-Ösophagus ein gastroösophagealer Reflux vor. Der Barrett-Ösophagus stellt eine Krebsvorstufe dar, deren weitere Progression zu einem AEG führt. (9) Das Risiko, an einem AEG zu erkranken, ist bis zu dreißigfach erhöht, wenn ein Barrett-Ösophagus vorliegt (12).

Es werden Barrett-Typen unterschieden: zwei zum einen der Short-Segment-Barrett-Ösophagus – d. h., die Länge der Metaplasie beträgt weniger als 3 cm – und zum anderen der Long-Segment-Barrett-Ösophagus mit mehr als 3 cm Metaplasie (10,11). Der Short-Segment-Barrett-Ösophagus macht 3-55 % der Barrett-Metaplasien ca. aus, während der Long-Segment-Barrett-Ösophagus in ca. 10–15 % der Fälle vorkommt (11). Bei Patienten mit einem Short-Segment-Barrett-Ösophagus ist das Progressionsrisiko niedriger als beim Long-Segment-Barrett-Ösophagus (10).

Des Weiteren werden Low-Grade- (LGD) und High-Grade-Dysplasien (HGD) unterschieden. Bei einer HGD hat die Dysplasie die Basalmembran noch nicht durchbrochen; es liegt die letzte Vorstufe zum invasiven AEG vor und wird endoskopisch reseziert. (6,11) Patienten mit einer Low-Grade-Dysplasie sollten innerhalb des ersten Jahres halbjährlich und dann jährlich untersucht werden. Bei High-Grade-Dysplasien ist nach der endoskopischen Resektion im ersten Jahr eine vierteljährliche Kontrolle notwendig und im zweiten Jahr ist eine halbjährliche endoskopische Kontrolle erforderlich. (13)

Auch das Rauchen von Tabak stellt durch die damit einhergehende Schädigung der DNA einen Risikofaktor dar. Ursächlich dafür ist das Vorliegen kanzerogener Substanzen im Tabakrauch, wie Nitrosaminen. (14) Gleichzeitig führt das Rauchen zu einer Funktionsstörung des Ösophagussphinkters und trägt damit zur Verstärkung des Refluxes bei. Auch Cook et al. konnten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Risiko, an einem AEG zu erkranken und der Anzahl der gerauchten Zigaretten am Tag feststellen. (15)

Zuletzt handelt es sich bei Adipositas um einen bedeutenden Risikofaktor. Pathophysiologisch rufen die Fettzellen eine Entzündungsreaktion im Körper hervor, wodurch es zur Ausschüttung von Adipokinen und Zytokinen kommt, die zur Karzinogenese beitragen. Zudem führt der erhöhte intraabdominale Druck zu einer Störung des Ösophagussphinkters und löst den Reflux vor. (14) Das Risiko, an einem Adenokarzinom zu erkranken, erhöht sich, je stärker die Fettleibigkeit ausgeprägt ist (16).

# 1.2.3 Klinik und Diagnostik

Ein AEG-Tumor wird häufig erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert, da lange Zeit keine Symptome bestehen. Erst in späteren Stadien kommt es zu Symptomen, die mit der Größe des Tumors korrelieren. (17) Das Leitsymptom ist die Dysphagie. Weitere Symptome, die die Patienten aufweisen können, sind unter anderem Gewichtsverlust und Erbrechen. (18)

Bei der Diagnostik des AEG-Tumors spielen vor allem die Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD), die Endosonographie (EUS) und die Computertomografie (CT) eine Rolle. Die ÖGD dient vor allem der Lokalisation und der Ermittlung der Siewert-Klassifikation. Eine gleichzeitig erworbene histologische Probe erlaubt die definitive Diagnosestellung. (18)

Für ein genaueres Staging werden die EUS (T- und N-Kategorie) und das CT (M-Kategorie) hinzugezogen (19). Hierbei ist die EUS zur Beurteilung der Infiltrationstiefe unerlässlich, um mittels des Ultraschallkopfes die Fünfschichtung der gastrointestinalen Wand zu beurteilen (5,19). Sie hat mit 85 % die höchste Treffsicherheit bezüglich der Beurteilung der Infiltrationstiefe (5,19). Das CT dient dem Nachweis von Metastasen, der zusätzlichen Beurteilung der Tumorgröße und der optimalen Darstellung benachbarter Strukturen. (18)

# 1.2.4 Definition, Klassifizierung

Das AEG wird sowohl dem Magen als auch dem Ösophagus zugeordnet. Aufgrund dieser Zuweisung kommt ihm eine Sonderstellung innerhalb der malignen Erkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes zu. Das AEG wird mittels der Siewert-Klassifikation eingeteilt, die seit dem Jahr 1998 verwendet wird und mit der der Tumor in Abhängigkeit seiner endoskopischen Läsion einer von drei Gruppen zugeordnet werden kann. (5) Hierbei erfolgt die Einteilung in Abhängigkeit der Lage des gastroösophagealen Übergangs (4,18). Die Tumore, die mit ihrem Epizentrum ca. 5 cm proximal des gastroösophagealen Übergangs liegen, werden dem Typ I zugeordnet. Typ-II-Tumore haben ihr Epizentrum ca. 1 cm oberhalb und 2 cm unterhalb des gastroösophagealen Übergangs, Typ-III-Läsionen ragen dagegen bis zu 5 cm in den Magen hin. (4,18)

Gleichwohl muss erwähnt werden, dass die Einteilung in verschiedene Typen schwierig ist, da die Tumorläsionen oftmals großflächig verbreitet sind und ein Epizentrum endoskopisch nur schwer zu definieren ist. (4) In der aktuellen achten Auflage der TNM-Klassifikation werden Typ I und II nach Siewert dem Ösophaguskarzinom zugeordnet, Typ III wird dem Magenkarzinom zugewiesen. (4)



Abbildung 1: Klassifikation des Adenokarzinomes des gastroösophagealen Übergangs nach Siewert. Quelle: Eigene Darstellung.

#### Laurén-Klassifikation

Nach der Laurén-Klassifikation kann der Tumor in histomorphologische Wachstumstypen eingeteilt werden. Es werden drei Typen unterschieden: der intestinale Typ, der diffuse Typ und der Mischtyp. (20,21)

Beim intestinalen Typ nach Laurén handelt es sich um einen begrenzt expansiv-polypös wachsenden Tumor, der hauptsächlich im distalen Magenabschnitt zu finden ist. Mit dem diffusen Typ nach Laurén ist wiederum ein diffuses infiltratives Wachstumsmuster gemeint. Dieses unscharf begrenzte Wachstum findet hauptsächlich in der Kardia statt. Ist keine eindeutige Klassifizierung in diffus oder intestinal möglich, wird ein Karzinom dem Mischtyp zugeteilt. (20,21)

# **TNM-Klassifikation**

Die TNM-Klassifikation, publiziert von der Union for International Cancer Controll (UICC), dient der Einteilung von Malignomen in Abhängigkeit der Kriterien Größe des Primärtumors (T), Lymphknotenbeteiligung (N) und Fernmetastasen (M). Diese Einteilung dient sowohl der Behandlungsplanung als auch der Prognoseabschätzung. Zusätzlich können Präfixe ergänzt werden. Das Präfix "p" weist auf ein postchirurgisches Staging hin, das vom Pathologen ermittelt wurde; das Präfix "c" basiert auf einem klinischen Staging. Ein Präfix "r" wird beim Auftreten eines Rezidivtumors verwendet. Erfolgt die Klassifikation während oder nach initialer multimodaler Therapie, wird das Präfix "y" hinzugefügt. (19,22)

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der Ösophaguskarzinome einschließlich der Karzinome des gastroösophagealen Übergangs nach der siebten TNM-Edition (19).

# T-Primärtumor

ТХ	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
то	Kein Anhalt für Primärtumor		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder		
	Submukosa		
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae		
T1b	Tumor infiltriert Submukosa		
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria		
Т3	Tumor infiltriert Adventitia		
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen		
T4a	Tumor infiltriert Pleura, Perikard, V. azygos, Zwerchfell oder		
	Peritoneum		
T4b	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen wie Aorta,		
	Wirbelkörper oder Trachea		

# N-Regionäre Lymphknoten

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1–2 Lymphknoten
N2	Metastasen in 3–6 Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

# M-Metastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

# **UICC-Klassifikation**

Die UICC-Klassifikation erlaubt eine bessere Abschätzung der Prognose (22).

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	MO
Stadium IIA	T1	N1	MO
Stadium IIB	T2	N0	MO
Stadium III	T1	N2	MO
	T2	N1, N2	MO
	T3, T4a	N0, N1, N2	MO
Stadium IVA	T4b	N0, N1, N2	MO
	Jedes T	N3	MO
Stadium IVE	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms nach der siebten Auflage der UICC (2009). (19)

# 1.3 Therapie

In Abhängigkeit vom Tumorstadium bei Diagnosestellung wird eine kurative oder palliative Therapie angestrebt. Das Ziel des kurativen Ansatzes ist die vollständige Heilung. Grundsätzlich wird bei einer kurativen Behandlung eine chirurgische Resektion angestrebt. Weitere Behandlungsmöglichkeiten sind die perioperative Chemotherapie und Radiochemotherapie. Eine palliative Behandlungsstrategie, die bei Inoperabilität verfolgt wird, hat das Primärziel, die Symptome der Erkrankung zu lindern. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 50–60 % aller Patienten einen Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen auf. Trotz Chemotherapie liegt die Gesamtüberlebensrate nur bei 9–11 Monaten. (23)

## 1.3.1 Endoskopische Behandlung

Die Standardtherapie in den Stadien Tis und T1a ist die endoskopische Behandlung. (18)

Es kann zwischen zwei Verfahren unterschieden werden: der endoskopischen Submukosadissektion (ESD) und der endoskopischen Mukosaresektion (EMR).

Bei beiden Verfahren werden zuerst die Resektionsränder markiert. Danach kommt es zur Unterspritzung der malignen Veränderung, um eine Vergrößerung der Submukosa zu erlangen. Bei der ESD wird daraufhin die Mukosa entfernt, anschließend erfolgt die Dissektion der Submukosa. Danach wird die Läsion verschlossen. Beim EMR-Resektionsverfahren kommt es nach der Unterspritzung zur Abtragung der Läsion mittels einer Schlinge (24–26).

Der Vorteil der ESD ist ein insgesamt geringeres Rezidivrisiko. Nachteilig ist dagegen die schwierige technische Durchführung und die damit verbundene lange Eingriffsdauer. (5) Die ESD ist das präferierte Verfahren, da keine garantierte größenunabhängige R0-Resektion bei der EMR vorgenommen werden kann und die EMR somit nur in Ausnahmefällen verwendet werden sollte (25,27).

Sollte nach der endoskopischen Resektion ein Tumornachweis am Resektionsrand vorhanden sein, kann eine weitere endoskopische Resektion unternommen werden. Bei erneutem Tumornachweis im Resektionsrand ist ein weiterer chirurgischer Eingriff notwendig. (25)

Eine endoskopische Therapie darf nicht bei einer Lymph- (L1) oder Veneninvasion (V1) sowie bei einem Differenzierungsgrad > Grading G3, einer Ulzeration und einer Submukosainfiltration von über 500  $\mu$ m durchgeführt werden (25).

# 1.3.2 Chirurgische Resektion

Ein chirurgischer Eingriff sollte bei den Tumorstadien von T1b bis T4 durchgeführt werden (19,25). Dabei wird die vollständige Entfernung des Tumorgewebes (R0-Resektion) und eine regionäre Lymphknotendissektion angestrebt (19). Dieser kurative Ansatz ist jedoch nicht gegeben, wenn der Tumor in nicht resektable Strukturen (Aorta, Wirbelkörper, Trachea) vorgedrungen ist und wenn Fernmetastasen vorliegen. Es erfolgt dann eine palliative Strategie. (25)

Das häufigste chirurgische Vorgehen beim AEG-Typ I ist die transthorakale (sub-) totale Ösophagektomie mit Resektion des proximalen Magens und Rekonstruktion mit Magenhochzug (18,19). Dabei wird eine Laparotomie/Laparoskopie durchgeführt, um den Magen zu mobilisieren (18). Anschließend wird der Thorax mittels Thorakotomie/Thorakoskopie eröffnet (28). Es kommt dann zur Resektion des Ösophagus und zu einer Zwei-Feld-Lymphknotendissektion. Zuletzt findet die Anastomosierung des proximalen Ösophagusstumpfes mit dem Magenschlauch statt. (18,19)

Beim AEG-Typ II erfolgt die Resektion mit Hilfe einer transthorakalen Ösophagusresektion oder einer transhiatal erweiterten Gastrektomie mit distaler Ösophagusresektion. Zurzeit werden beide Verfahren mittels der CARDIA-Studie hinsichtlich ihrer Heilungsrate und ihrer Lebensqualität evaluiert. (18,19,29)

Beim AEG-Typ III wird eine totale Gastrektomie mit distaler Ösophagusresektion durchgeführt. Sowohl bei AEG-Typ-II-Tumoren (wenn transhiatal erweitert gastrektomiert) als auch bei AEG-Typ-III-Tumoren erfolgt eine D2-Lymphadenektomie. (18,19,25)

#### Lymphknoten

Beim AEG-Typ I kommt es hauptsächlich zu einem Lymphknotenbefall der paraösophagealen Lymphknoten des unteren Mediastinums und der oberen abdominalen Lymphknoten. Es liegen bei über 15 % der Patienten auch befallene Lymphknoten in der trachealen Bifurkation und im oberen Mediastinum vor. (18) Der AEG-Typ II weist sowohl befallene Lymphknoten im hinteren Mediastinum als auch abdominale Lymphknoten in der kleinen Kurvatur, in der linken Magenarterie und im Truncus coeliacus auf. (18)

Abdominale Lymphknoten sind hauptsächlich beim AEG-Typ III befallen. (18) Die Lymphknotendissektion wird abhängig vom Operationsverfahren durchgeführt. Beim AEG-Typ I erfolgt die Resektion durch eine transthorakale Ösophagektomie. Hierbei werden die Lymphknoten mittels einer 2-Feld-Lymphknotendissektion entfernt. Im Rahmen dieser findet eine D2-Lymphadenektomie statt, die auch beim AEG-Typ III zur Dissektion Anwendung findet. Beim AEG-Typ II wird im Verlauf einer transthorakalen Resektion eine 2-Feld-Lymphknotendissektion durchgeführt, beim transhiatalen Verfahren erfolgt hier ebenfalls eine D2-Lymphadenektomie. (25,30)

Mit zunehmender Infiltrationstiefe des Primärtumors steigt das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung. Bei einem mukosalen Tumor (T1a) liegt das Risiko, dass die Lymphknoten befallen sind, bei 0–2 %. Im T1b-Stadium liegt die Wahrscheinlichkeit dagegen bei ca. 22–29 %, für die Stadien T2–T4 kann eine Wahrscheinlichkeit von 71–81 % angegeben werden. (31–33)

#### 1.3.3 Perioperative Chemotherapie

Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen erfolgt ein multimodales Therapiekonzept, das neben der Tumorresektion aus einer perioperativen Chemotherapie oder einer neoadjuvanten Radiotherapie/Radiochemotherapie besteht (19,25,34,34,35).

Entsprechend den Leitlinien wird eine alleinige präoperative Chemotherapie nicht empfohlen, da bei ca. 29–40 % der Patienten schwere Nebenwirkungen auftraten (19,25,35).

Die englische MAGIC-Studie bewies, dass die perioperative Chemotherapie die Gesamtüberlebensrate von 24 % auf 38 % erhöht (18,25,35). Die perioperative Chemotherapie wird in Deutschland aktuell meist nach dem FLOT-Schema (5-Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin und Docetaxel) durchgeführt. Dieses Schema löste das ECF-Schema (Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil) und das ECX-Schema (Epirubicin, Cisplatin und Capecitabine) ab, da die FLOT4-Studie die Erkenntnis brachte, dass bei der Therapie mit dem FLOT-Schema die Remissionsraten sinken und das Gesamtüberleben von 18 Monaten (ECF) auf 30 Monaten steigt. (25,36)

Der CROSS-Studie aus dem Jahr 2012 ist zu entnehmen, dass die präoperative Radiochemotherapie die Gesamtüberlebenszeit verbessert. Die Patienten erhielten eine präoperative Radiation von 41,1 Gy mit wöchentlicher Chemotherapie für fünf Wochen. (18,35) Es kam zu einem Anstieg der medianen Gesamtüberlebensrate von 27,1 Monaten auf 43,2 Monaten und zu häufigeren R0-Resektionen (35). Zudem stieg die postoperative Mortalität nicht (37).

Sollte es unter der präoperativen (Radio-) Chemotherapie zu einer Progression des Tumors kommen, wird die präoperative Therapie unterbrochen und es wird frühzeitig operiert (19).

#### 1.3.4 Palliative Therapie

Bei Patienten mit T4b-Tumoren – das heißt, der Tumor hat sich auf nicht resektable Strukturen ausgebreitet oder/und es liegen Fernmetastasen vor – sollte keine chirurgische Therapie durchgeführt werden, sondern eine palliativ intendierte Behandlung angestrebt werden. Ziel der palliativen Therapie ist die Verlängerung der Überlebenszeit bei gleichzeitigem Erhalt der Lebensqualität. (19) Die mediane Gesamtüberlebenszeit liegt bei ca. 9–11 Monaten (23).

Als Erstlinientherapie kann bei Patienten ohne HER2-Expression die Chemotherapie nach dem FLOT-Schema durchgeführt werden (19,25,35). Besteht eine HER2-Positivität, sollte die Chemotherapie in Kombination mit Trastuzumab erfolgen (25,35). Eine Zweitlinientherapie kann mit Irinotecan, Paclitaxel, Docetaxel und dem VEGF-Antikörper Ramucirumab durchgeführt werden. Eine Behandlung mittels PD-L1/PD-1-Inhibitor ist in Europa noch nicht zugelassen. (25)

# 1.4 Immunmodulatorische Therapie

Zu den neuen Therapieansätzen gehört unter anderem die Verwendung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Der grundlegende Ansatz dieser Therapie besteht darin, durch die Inhibition dieser Checkpoints eine vorhandene anti-tumorale Immunantwort auszulösen. (38)

Der Krebs-Immunitäts-Zyklus besteht aus einem mehrstufigen Prozess und wird von mehreren Checkpoints bestimmt. In der immunonkologischen Therapie werden diese Checkpoint-Moleküle gezielt gehemmt, um so den Zyklus neu auszulösen und die Immunantwort zu aktivieren. (38,39) Damit die anti-tumorale Immunantwort ausgelöst werden kann, muss der Tumor von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (TIL) infiltriert sein (40,41). Daher steht ein hoher TIL-Wert für eine gute Prognose und führt zur Erhöhung der Gesamtüberlebensrate (42).

Tote Karzinomzellen führen zur Ausschüttung von Antigenen, die dann von dendritischen Zellen über MHC-I- und MHC-II-Molekülen den T-Zellen präsentiert werden. Die aktivierten effector-T-Zellen wandern anschließend zum Tumorgewebe, um dort den Tumor zu infiltrieren. Hier findet daraufhin die Bindung

zur Karzinomzelle über den T-Zell-Rezeptor (TCR) und das entsprechende Antigen statt. Die darauffolgende Eliminierung der Karzinomzelle führt zu weiteren Ausschüttungen von Karzinomantigenen. (38,39)

1.4.1 PD-L1

Die T-Zell-Aktivierung wird zum Teil von der B7-Familie reguliert, zu der das Transmembranprotein PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) und der dazugehörige Rezeptor PD-1 (Rezeptor Programmd cell death 1) gehören. Die Bindung dieses Komplexes führt zu einer Herunterregulierung der T-Zell-Aktivität. (43) Diese Methode wird auch vom Tumorgewebe genutzt, in dem es zur Hochregulierung des PD-L1-Moleküls kommt und somit zu einer immunsuppressiven Tumorumgebung (44,45).

Die Blockierung von PD-1/PD-L1 mittels monoklonaler Antikörper führt dazu, dass T-effector-Zellen wieder ihre anti-tumorale Funktion aufnehmen können und die endogene Tumorimmunität gehemmt wird. (44)

Eine Hochregulation vom PD-Liganden liegt bei ca. 40 % aller gastroösophagealen Karzinome vor (47). Hingegen muss erwähnt werden, dass trotz negativer PD-L1-Expression PD-Antikörper Wirkung zeigen können und bei positiver Expression auch keine Wirkung zeigen müssen. (44)

Bei Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor) konnte in der Phase-III-Studie (Keynote-181) ermittelt werden, dass die mediane Gesamtüberlebenszeit bei der Interventionsgruppe (Chemotherapie und Pembrolizumab) bei 9,3 Monaten lag, bei der Placebogruppe (alleinige Chemotherapie) dagegen nur 6,7 Monate erreichte. Die PD-L1-Inhibitoren Avelumab und Durvalumab werden beide momentan evaluiert. (4)

#### 1.4.2 CTLA4

Im Immunsystem besteht eine fein abgestimmte Homöostase. Um diese Homöostase permanent aufrecht zu erhalten, werden Oberflächenproteine wie das CTLA4 benötigt. CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associates Protein 4) ist ein Protein, das an der negativen Immunregulation beteiligt ist. (39,48) Es wird auf der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert und konkurriert mit CD28 um die Bindungsstelle an CD80 und CD86 (48). Durch die Bindung am Rezeptor kommt es zur Hemmung von dendritischen Zellen und damit zur Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung. Dieser Mechanismus dient dem Körper als Schutz vor Überreaktionen des Immunsystems. (39)

Ipilimumab ist ein monoklonaler Antikörper, der zurzeit in Phase-II-Studien evaluiert wird. Die Ergebnisse stehen noch aus. (4)

#### 1.4.3 HER2

Neben Immun-Checkpoint-Inhibitoren werden auch monoklonale Antikörper genutzt, die Einfluss auf Wachstumsfaktoren wie HER2 und VEGF haben.

HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) gehört zur Gruppe der EGF (epidermal growth factor)-Rezeptoren und wird den Tyrosinkinase-Rezeptoren zugeordnet. (49,50)

Die Behandlung mittels eines HER2-Antikörpers ist nur dann sinnvoll, wenn der Tumor eine Überexpression vorweisen kann, weshalb ein histologischer Nachweis im Voraus notwendig ist. Hierbei werden hauptsächlich zwei histologische Methoden verwendet: zum einen die Immunhistochemie (IHC) und zum anderen die In-situ-Hybridisierung (FISH). Bei der IHC werden die Rezeptoren an der Zelloberfläche angefärbt. Anschließend erfolgt die Auswertung anhand der Intensität und des Ausmaßes der Anfärbung. (51)

Score 0: keine Überexpression

Score 1+: IHC negativ, keine Überexpression

Score 2+: IHC zweifelhaft, fragliche Überexpression

Score 3+: IHC positiv, starke Überexpression

Bei einem Score 2+ sollte grundsätzlich ein weiterer Test hinzugezogen werden. (51)

Bei der FISH binden fluoreszierende Proben an bestimmte DNA-Sequenzen. Danach werden die dadurch markierten Gene ausgezählt. (51) Die Expression wird anschließend einer der vier Gruppen zugeordnet: ISH 0, ISH 1+, ISH 2+, ISH 3+. Als ISH-positiv wird ein Score von ISH 3+ bezeichnet (52). Tumore gelten als HER2-positiv, wenn sie bei der FISH-Amplifikation ≥2 sind oder IHC 3+ zugeordnet werden können. (51)

Bei etwa 20 % aller fortgeschrittenen Karzinome des gastroösophagealen Übergangs liegt eine Überexpression von HER2 vor (53). Ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen den HER2-Rezeptor richtet, ist Trastuzumab. (49) In der ToGA-Studie aus dem Jahr 2010 wurde ermittelt, dass die Behandlung mit Trastuzumab in Verbindung mit einer Capecitabin oder 5-FU und Cisplatin-Chemotherapie zu einer signifikanten Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit (von 11,1 Monate auf 13,8 Monate) bei metastasierten Patienten führt. Die besten Ergebnisse lagen bei Patienten vor, die IHC 3+ oder FISH-positiv waren. (25,51) Daher erhalten Patienten mit einem AEG-Tumor, die HER2-positiv sind, eine Chemotherapie in Kombination mit Trastuzumab (25,54).

#### 1.4.4 VEGF und VEGFR

VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein bedeutendes Signalmolekül, das seine Wirkung nach der Bindung am Tyrosinkinase-Rezeptor VEGFR entfaltet. Das VEGF-Protein stimuliert das Wachstum von Blutgefäßen, dient der Zellproliferation sowie der Zellmigration und erhöht die vaskuläre Permeabilität. (55) Gleichzeitig beugt VEGF der Apoptose von Endothelzellen vor (53).

Zur VEGF-Ligandenfamilie gehören sechs Wachstumsfaktoren: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der Plazenta-Wachstumsfaktor (PIGF). Es werden drei Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3) unterschieden, die in ihrer Expression, ihrer Ligandenspezifität und ihrer Funktion variieren. (53) Die Rezeptoren werden auf Endothelzellen und Immunzellen exprimiert (56).

Die Expression von VEGF und VEGFR erfolgt nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf Tumorzellen. VEGF unterstützt die Tumorangiogenese, indem es zur Neubildung von Blutgefäßen anregt, die in den Tumor eindringen können und diesen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen, wodurch das Wachstum des Tumors gestärkt wird. (56) Gleichzeitig kann es die Funktion von Immunzellen, die in der Tumorumgebung vorhanden sind, dahingehend beeinflussen, dass die Immunantwort auf den Tumor positiv ausfällt. So kontrollieren die regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>) die Autoimmunität und die Reaktion auf fremde Antigene. Sie sind anti-tumoral und können mittels Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) nachgewiesen werden. (57, 58)Der VEGF-Wachstumsfaktor aus dem Tumorgewebe zieht regulatorische T-Zellen an, wodurch eine Immunsuppression im Tumorgewebe entsteht. Immunzellen sind nicht mehr in der Lage, den Tumor anzugreifen, zeitgleich kommt es zu einer Tumorprogression. (57) Das VEGF-Protein scheint ein prognostischer Biomarker zu sein, da erhöhte Werte im Blut eine Progression des Tumors anzeigen (53,59). Heutzutage gibt es Angiogenesehemmer, die therapeutisch eingesetzt werden, um die Wirkung von VEGF zu blockieren. Ramucirumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen VEGFR-2 gerichtet ist. Am VEGFR-2, dem bedeutendsten Rezeptormolekül der Angiogenese und der Permeabilitätserhöhung, binden die Liganden VEGF-A und VEGF-E. Nach der Bindung kommt es zur Auslösung der Angiogenese. (53) Ramucirumab bindet an der Domäne 3 des Rezeptors und ändert damit die Konformation des Rezeptors dahingehend, dass kein Ligand mehr an diesem Rezeptor binden kann (60). Innerhalb der REGARD-Studie wurde in einer Monotherapie ermittelt, dass die mediane Gesamtüberlebenszeit mit Ramucirumab bei der Interventionsgruppe bei 5,2 Monaten lag, bei der Placebogruppe wurden dagegen nur 3,8 Monate erreicht. Gleichzeitig lag das mediane progressionsfreie Überleben in der Antikörpergruppe bei 2,1 Monaten und in der Placebogruppe bei 1,3 Monaten. (25,53)

In der RAINBOW-Studie wurden die Behandlungen mit Paclitaxel und Ramucirumab und einem Placebo verglichen. (25,52) Die Gesamtüberlebenszeit konnte von 7,4 Monate (mit Placebo) auf 9,6 Monate (mit Ramucirumab) verbessert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Anwendung von Ramucirumab als Monowirkstoff in der Zweitlinientherapie oder in Kombination mit Paclitaxel nach einer platinium- und fluoropyrimidine Chemotherapie zugelassen. (53,60)

#### 1.5. Die Tumor-Stroma-Interaktion in Bezug auf die Genexpressionen

Jedes Karzinom des gastroösophagealen Übergangs besteht aus einem Tumorzellund einem Stromaanteil. Im Stroma befinden sich unter anderem Glykosaminoglykane, Fibrin und Kollagen. Außerdem liegen unterschiedliche Zellen vor: Fibroblasten, Epithelzellen, vaskuläre Zellen und Immunzellen. (61) Diese Komponenten begünstigen die Tumorprogression und die Metastasierung, da sie eine immunsupressive pro-tumorale Umgebung schaffen. Sie induzieren angiogenetische Prozesse, sekretieren Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$ , und aktivieren Mechanismen, die eine Immundetektion verhindern. (61–63)

Es werden zwei Arten von Immunantworten unterschieden: die angeborene, unspezifische Immunabwehr und die adaptive, spezifische Immunabwehr. Die angeborene Immunabwehr besteht neben Barrieren und humoralen Elementen aus zellulären Bestandteilen: aus Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen und neutrophilen Granulozyten. (64) Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen erkennen Pathogene anhand ihrer PRRs (Pattern Recognition Receptor). Sie phagozytieren das Pathogen und präsentieren es im Anschluss auf ihrer Zelloberfläche. Es kommt zur Aktivierung der naiven T-Zelle über den TCR-Rezeptor und dem MHC-Komplex auf dendritischen Zellen. Kostimulatorische Signale, wie sie z. B. mittels CD28 stattfinden, müssen ebenfalls auf der T-Zelle erfolgen, damit eine vollständige T-Zell-Aktivierung stattfindet. (65,66)

Das adaptive Immunsystem wird aus den T- und B-Zellen gebildet. Es kommt zur Erkennung der spezifischen Pathogene und zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die naive T-Zelle differenziert sich nach Aktivierung in eine zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zelle, die direkt das Pathogen/die Tumorzelle zerstört oder in eine CD4<sup>+</sup>-T-Helferzelle, die B-Zellen aktiviert. T-Zellen stellen den zellulären Anteil der adaptiven Immunantwort dar. B-Zellen und Plasmazellen bilden Antikörper und sind für den humoralen Anteil der adaptiven Immunantwort zuständig. (65,66)

# T-Zellen

Im Stroma liegen CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen vor, die in der Lage sind, maligne Zellen zu zerstören. Das Stromagewebe hat jedoch Mechanismen entwickelt, die die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen daran hindern, das Tumorgewebe zu infiltrieren oder/und ihre Funktion zu hemmen. So exprimieren die Tumorzellen PD-L1, die bei Bindung am PD-1-Rezeptor zur Herunterregulierung der T-Zellen führen. Tumorzellen können durch die Produktion von Chemokinen wie CXCL9, CXCL10 und CXCL11 die Infiltration von CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen in das Stroma reduzieren. (67)

Die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen aktivieren CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen und dendritische Zellen. Zudem unterstützen sie die CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen Zellen, indem sie IL-2 und IFN-γ sekretieren. (68,69)

Außerdem liegen regulatorische T-Zellen (Tregs) vor. Die Hauptfunktion der Tregs ist es, die Immunantwort zu regulieren. (70) Im Tumor üben sie eine immunsuppressive und pro-tumorale Antwort aus, indem sie immunsuppressive Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 ausschütten. (71,72) TGF- $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor, IL-10 und CTLA-4 supprimieren die T-Zell-Aktivierung. (73–75) Tregs werden durch die Expression von CTLA-4, CD25, STAT5 und FoxP3 bemerkbar (76).

# Makrophagen

Im Tumor herrscht ein hypoxisches und pH-niedriges Millieu vor (63). Makrophagen dringen aufgrund der Hypoxie in das Tumorgewebe ein (72). Es werden zwei Makrophagen-Phänotypen unterschieden: zum einen die pro-inflammatorischen anti-tumoralen M1-Makrophagen und zum anderen die anti-inflammatorischen pro-tumoralen M2-Makrophagen. (63,71)

Durch die hypoxischen Gewebsverhältnisse und aufgrund der Beteiligung von IL-4, IL-6 und IL-10 sowie TGF- $\beta$ , die von Tumorzellen freigesetzt werden, finden sich im Stroma tumor-assozierte Makrophagen (TAM, M2-Phänotyp). Sie verstärken die Progression des Tumors und supprimieren die Immunantwort durch die Ausschüttung von VEGF-A, IL-10, TNF $\alpha$  und MMPs. (61–63,72)

Tumor-assozierte Makrophagen sind mittels der Sekretion von IL-10, Prostglandinen und TGF- $\beta$  ebenfalls dazu fähig, die Infiltration der zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu verhindern. (67)

# **Dendritische Zellen**

Die hypoxischen Areale sind für dendritische Zellen inhibitorisch und schränken ihre Funktion ein. Dendritische Zellen sind für die Antigenpräsentation zuständig, die zur Aktivierung der T-Lymphozyten und somit zur adaptiven Immunabwehr führt. (71,77) Eine Hemmung der Funktion von dendritischen Zellen bewirkt eine Stärkung der Immuntoleranz und bedingt somit die Progression des Tumors (78). Die Funktion der dendritischen Zellen scheint durch viele Faktoren negativ beeinflusst zu sein. So führen unter anderem IL-6, IL-10, VEGF und TGF-β dazu, dass keine Reifung und Migration der dendritischen Zellen möglich sind. (79)

# Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten können in zwei Phänotypen unterteilt werden. N1-Neutrophile haben einen anti-tumoralen Effekt, indem sie zum einen Tumorzellen durch TNF $\alpha$ , NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zerstören und zum anderen T-, B- und NK-Zellen sowie dendritische Zellen aktivieren. (80) N2-Neutrophile stimulieren die Immunsupression, das Tumorwachstum und die Angiogenese. Sie werden im Tumor als tumor-assozierte Neutrophile (TAN, N2-Phänotyp) bezeichnet. TANs entwickeln sich aufgrund des Fehlens des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  oder aufgrund der Zunahme von Interferon- $\beta$  in den zweiten Phänotyp. Gleichzeitig führt die Präsenz von TGF- $\beta$  zum ersten Phänotyp. (80,81)

# Fibroblasten

Fibroblasten nehmen eine zentrale Rolle bei der Synthese der Extrazellulärmatrix und bei der Versorgung von Wunden ein. (61,82) Sie exprimieren Wachstumsfaktoren und Chemokine. Die Fibroblasten, welche im Tumor aktiviert sind, werden als tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF) bezeichnet. Sie bilden den Hauptbestandteil des Stromas fördern somit das Tumorwachstum. Zugleich sekretieren sie Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Des Weiteren unterstützen sie die Angiogenese mittels VEGF und PDGF. Die Fibroblasten werden unter anderem durch die Marker FAP, Vitmentin,  $\alpha$ -SMA und MYL9 repräsentiert. (72,82–84)

# 1.6 Die Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese kann in zwei Abschnitte unterteilt werden: zum einen in die Transkription, deren Endprodukt die RNA ist und zum anderen in die Translation, die für die Synthese der Proteine verantwortlich ist. (65)

Vor einer Transkription kommt es zur Antirepression der DNA. Bei diesem Vorgang wird das komprimierte Heterochromatin in das weniger komprimierte Euchromatin umgewandelt. Die RNA-Polymerase II bindet am Promoter, dem Startpunkt auf der DNA. Eine Promoter-Region ist durch Adenin-Thymin-reiche Bereiche charakterisiert, die sich oberhalb des Startpunktes befinden. Diese Region wird als TATA-Box bezeichnet und ist durch weitere Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet,

die den Startpunkt für die Initiation markieren. Zusammen mit dem TATA-Box-bindenden Faktor (TBP), den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) und weiteren Transkriptionsfaktoren bilden sie einen Komplex, der den Startpunkt für die RNA-Polymerase II kennzeichnet. (65,85,86)

Im nächsten Schritt wird die Doppelhelix der DNA mittels der Helikase getrennt. Der Initiationskomplex der entwundene **DNA-Abschnitt** und bilden die Transkriptionsblase. Es wird nun die DNA in 3'->5'-Richtung abgelesen und die RNA wird in 5'->3'-Richtung synthetisiert. Die Transkription wird beendet, sobald die RNA-Polymerase eine Terminationssequenz erreicht hat. Es liegt nun eine hnRNA (= prä-mRNA) vor. Diese Ribonukleinsäure muss noch prozessiert werden. Die Prozessierung besteht aus drei Teilen. Zunächst werden die Introns, d. h. die Abschnitte im Gen, die nicht codiert sind, entfernt. Diese codierten Abschnitte werden als Exons bezeichnet. Die Entfernung der Introns und das Verknüpfen der Exon-Abschnitte wird als Spleißen bezeichnet. Beim alternativen Spleißen ist es möglich, durch unterschiedliche Exon-Verknüpfungen oder durch gezielte Einbeziehungen oder gezieltes Auslassen von Exons unterschiedliche Trankskripte aus einem Genabschnitt herzustellen und somit unterschiedliche Proteine zu codieren. (65,85,86)

Ein weiterer Schritt der Prozessierung ist das Anfügen der Cap-Struktur am 5'-Ende. Bei einer Cap-Struktur handelt es sich um ein methyliertes GTP an der Position 7, das dem Schutz des Ribosoms dient. Der dritte Teil der Prozessierung ist das Anfügen eines 50–200-AMP-Restes am 3'-Ende. Am Ende der Transkription liegt ein einzelner RNA-Strang vor, der als Matrizenstrang gekennzeichnet wird. Dieser wandert in das Zytosol, wo die Translation beginnt. (65,85,86)

Die Translation findet im Ribosom statt und dient der Herstellung der Proteine aus Aminosäuren. Drei Basen (Codon) codieren zu einer bestimmten Aminosäure, wobei einige Aminosäuren auch durch mehrere Codons codiert werden können. Die Transfer-RNA (tRNA) übersetzt die Basensequenz in eine Aminosäure. Sie trägt das Anticodon, d. h. die zum Codon der mRNA komplementären Basen. (65,85,86) Die Aminosäuren werden unter ATP-Verbrauch von Aminoacyl-tRNA-Synthasen an die tRNA gekoppelt. Dafür muss die Aminosäure mit ATP verknüpft werden und somit auch aktiviert werden. Dafür spaltet die Aminoacyl-tRNA-Synthase den AMP-Rest und koppelt die Aminosäure am 3'-Ende der tRNA. Anschließend wird die Aminosäure auf die 3'-OH-Gruppe der Ribose übertragen. Hierfür müssen die zwei Untereinheiten des Ribosoms zusammen vorliegen. (65,85,86)

Zuerst bildet die Starter-tRNA, die Methionin trägt, mit dem eIF-2 (eukaryontischen Initiationsfaktor) und dem GTP einen Komplex, der mit elF-1, elF-1A und elF-3 an die kleine 40S-Untereinheit bindet. Es entsteht der 43S-Präinitiationskomplex. Die mRNA bindet dann am Initiationsfaktor elF-4, der wiederum mit elF-3, das im Präinitiationskomplex vorliegt, eine Verbindung eingeht. Es entsteht der 48S-Präinitiationskomplex, der die mRNA am Ribosom entlang führt, bis sie auf ein Startcodon (AUG) trifft und am elF-2 das GTP hydrolysiert. Daraufhin wird GDP-eIF-2 dissoziiert. Im weiteren Verlauf assemblieren sich die kleine und große Untereinheit zum Ribosom. Im folgenden Schritt der Elongation werden die nächsten Peptidbindungen geknüpft. Die Aminiacyl-tRNA bindet mit dem Anticodon an das Codon am leeren Akzeptorort, einem Bindungsort des Ribosoms. Sie wird vom Elongationsfaktor eEF-1A unterstützt. Im Peptidylort, einer weiteren Bindungsstelle am Ribosom, liegt eine vorherige tRNA gebundene Peptidkette vor. Diese Kette wird auf die Aminogruppe der neuen tRNA übertragen und mit dem Elongationsfaktor eEF-2 um ein Triplett verschoben. Erreicht die mRNA ein Stopp-Codon findet die Termination der Translation statt. (65,85,86)

# 1.7 Die histopathologische Untersuchung

Die histopathologische Untersuchung ist eines der wichtigsten diagnostischen Mittel, um weitere Informationen über die Tumorerkrankung zu erhalten. (87) müssen Um eine histopathologische Untersuchung durchzuführen. die Gewebeproben aufbereitet werden. Dafür wird nach der Entnahme der Biopsie das Gewebe zuerst in Formaldehyd eingebettet und anschließend in dünne Schnitte an einem Mikrotom präpariert. Es entstehen dabei Schnitte zwischen 1-8 µm, welche auf einen Objektträger zur weiteren Untersuchung aufgetragen werden. (87) Bei dieser konventionellen Methode erfolgt eine irreversible Dissektion des Gewebes, welche durch neuere Methoden wie die GeoMx® Digital Spatial Profiling Methode vermieden werden kann. Hier werden die Zellen und Strukturen im Gewebe erhalten, ohne dass es zu einem Informationsverlust kommt (88,89).

# 1.8 Ziel der Studie

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgte eine guantitative Untersuchung von onkologischen und immunologischen Markern auf Protein- und RNA-Ebene im Tumor- und Stromagewebe. Hierbei fand die Analyse des Gewebes mithilfe einer neuen diagnostischen Methode statt: bei der GeoMx® Digital Spatial Profiling-Methode (DSP) wird das Gewebe ohne Dissektion untersucht. Dabei werden zuerst morphologische Regions-of-Interest (ROI) im Tumor und Stroma festaeleat: anschließend erfolat die quantitative Messung von immuno-onkologischen Markern auf Protein- und RNA-Ebene.

Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, ob eine Differenzierung zwischen Tumor- und Stromagewebe aufgrund unterschiedlich exprimierter Biomarker auf Protein- und RNA-Ebene möglich ist. Die Untersuchung sollte zu einer besseren Charakterisierung des Tumors beitragen, indem die Interaktionen zwischen den beiden Geweben analysiert wurden. Zugleich sollte herausgefunden werden, ob die Expressionsmuster nach einer neoadjuvanten Therapie variieren.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Biomarker prognosebestimmend sind. Dafür wurden die differentiellen Expressionsanalysen auf Protein- und RNA-Ebene mit klinischen Daten korreliert.

Abschließend sollte Kenntnis darüber erlangt werden, ob die einzelnen Gewebearten auf ihren Protein- und RNA-Expressionen vergleichbar sind und ob eine Homogenität oder Heterogenität innerhalb eines Tumor- und Stromagewebes vorhanden ist. In diesem Zusammenhang sollte die Möglichkeit einer Reproduzierbarkeit zweier Areale aus einer Biopsie ermittelt werden.

# 2 Methoden

# 2.1 Auswahl der Patienten, klinische Datenerhebung

Für die Studie wurden 39 Patienten ausgewählt, welche im Zeitraum von 1993 bis 2014 aufgrund eines AEG-Typ II in kurativer Intention im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck operiert worden waren.

Es wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt:

- histopathologisch gesichertes AEG-Typ II und
- kurativ intendierte chirurgische Resektion.

Als Ausschlusskriterien galten:

- AEG-Typ I und III,
- Plattenepithelkarzinom des gastroösophagealen Übergangs,
- alleinige endoskopische Behandlung und
- palliatives Therapiekonzept.

Anhand der Patientenakten wurden folgende Parameter erhoben:

# Allgemeine Daten und Anamnese

- Alter in absoluten Zahlen
- Alter (≤ 63 Lebensjahr/> 63 Lebensjahr)
- Geschlecht
- Status überlebend/verstorben
- mediane Überlebenszeit in Monaten nach der Operation
- Gesamtüberlebenszeit (≤ 21 Monate/> 21 Monate)
- Gesamtüberlebenszeit bis 90 Tage
- Gesamtüberlebenszeit bis 1 Jahr
- Gesamtüberlebenszeit bis 5 Jahre
- Rezidiv (positiv/negativ)
- Rezidiv in Monaten
- Body-Mass-Index ( $\leq 30 > 30$ )
- Gastritis (positiv/negativ)

- Raucher (positiv/negativ)
- Alkoholiker (positiv/negativ)
- Stenose (positiv/negativ)

# Präoperatives Staging

- cT (cT1-4)
- cT (low cT 1–2/high cT 3–4)
- cN (N1, N2, N3/N0)
- cM (positiv/negativ)
- Laurén-Klassifikation (intestinaler Typ, diffuser Typ, Mischtyp)

# Pathologische Angaben

- pT (pT1–4)
- pT (pT 1–2 low/pT 3–4 high)
- pN (N1, N2, N3/N0)
- pM (positiv/negativ)
- Grading (G1–G4)
- Grading (low G1–2/high G3–4)
- Lymphknotenratio  $\leq 0,5/>0,5$
- Tumorgröße in absoluten Zahlen
- Tumorgröße (≤ 4,5 cm/> 4,5 cm)
- bei Vorliegen von siegelringzelligen Karzinomen: % der Siegelringzellen im Tumor

Zur Ermittlung des Tumorstagings wurden Endosonografie, CTs, PET-CT und die Laparoskopie genutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte retrospektiv.

# 2.2 Patientenproben

Für die vorliegende Studie wurden Proben aus den formalin-fixierten paraffineingebetteten Operationspräparaten (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) der ausgewählten Patienten verwendet. Diese wurden zunächst in ein Tissue-Microarray transferiert.

# 2.2.1 Tissue-Microarray

Die Tissue-Microarray-Herstellung (TMA) erfolgte am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Zuerst wurde dabei jeweils ein Zylinder des Tumorgewebes mit Hilfe eines Gewebe-Stanzgeräts aus den paraffin-eingebetteten Operationspräparaten entnommen. Die Auswahl des Gewebes erfolgte durch vorherige Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

# 2.2.2 GeoMx® Digital Spatial Profiling

Zur quantitativen Ermittlung der immuno-onkologischen Marker wurde die kommerziell verfügbare Methode GeoMx® DSP, eine Technik der Firma Nanostring verwendet.

Mit Hilfe der DSP-Methode wird eine quantitative Messung von Biomarkern auf RNA- und Protein-Ebene durchgeführt, ohne das FFPE-Gewebe zu zerstören (90). Zuerst wurden den Proben zwei Reagenzien zugesetzt. Das erste Reagenz enthielt fluoreszierende Antikörper, die an CD45, PAN-Zytokeratin, DNA und SMA binden. Während CD45 für die Detektion von Leukozyten genutzt wird, eignet sich PAN-Zytokeratin zur Feststellung von Tumorzellen. Dagegen wird SMA verwendet, um die glatte Muskulatur zu erkennen. (90–92) Diese erste Reagenz diente der Visualisierung der Tumorareale und des umgebenden Stromas in den Proben. Auf Basis dieser Färbung wurden geeignete ROIs ausgewählt und markiert. Diese ROIs sollten jeweils repräsentative Areale des Tumorgewebes und des umgebenden Stromas enthalten. Die Tumor- und Stromaareale wurden hiernach in den jeweiligen Bereichen für die spätere gesonderte Auswertung der Expressionsmuster elektronisch markiert. (93) Den ROIs wurde anschließend das zweite Reagenz

zugesetzt, um eine genaue quantitative Messung durchführen zu können (93). Es enthielt Antikörper, die sich gegen ausgewählte immuno-onkologische Marker auf Protein- und RNA-Ebene richten. Jeder dieser Antikörper war über einen UV-sensitiven Liganden mit Oligonukleotiden verbunden. (94,95) Nach der Bindung fand eine Reinigung des Präparates mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) statt, um die ungebundenen Antikörper-Oligonukloetid-Komplexe zu entfernen (94).

Anschließend wurden in den elektronisch markierten Bereichen (Tumor, Stroma) separat die UV-sensitiven Liganden mittels UV-Licht vom Antikörper gelöst (95). Die freigelösten Oligonukleotiden wurden danach mit der Mikropipette maschinell aufgenommen und in eine Mikrotiterplatte übertragen. Anschließend erfolgte eine Analyse im nCounter®, wobei die Oligonukleotide digital gezählt und in vierfarbigesechsteilige Barcodes hybridisiert wurden. (90) Im Folgenden wurden diese digitalen Zählungen ausgewertet und die Ergebnisse wurden normalisiert (93,96).



Abbildung 2: Ablauf der DSP-Methode.

(Abdruck mit Genehmigung von Nanostring.)

- 1. Färbung mit dem ersten und zweiten Reagenz
- 2. Auswählen der ROIs
- 3. Lösung der UV-sensitiven Liganden in den ROIs mit Hilfe von UV-Licht
- 4. Aufnahme der Oligonukleotiden
- 5. Übertragung in eine Mikrotiterplatte
- 6. Wiederholung des Ablaufes für jede ROI
- 7. Hybridisierung in vierfarbig-sechsteilige Barcodes gefolgt von der digitalen Zählung im nCounter® System
| Abteilung            |
|----------------------|
|                      |
| mmunologische Zellen |
|                      |
| F                    |
| Iumor                |
|                      |
| ΝΔ                   |
|                      |
|                      |
| Glatte Muskulatur    |
|                      |
| r<br>C               |

Tabelle 3: Übersicht der Visualisierungsmarker

Das ausgewählte immuno-onkologische Panel entspricht einem Panel von Molekülen, welche aus der Literatur für ihre onkologische oder immunologische Relevanz bekannt sind und welche für die DSP-Methode von der Firma Nanostring etabliert und validiert wurden.

-	1	1	1
X	Abkürzung	Bezeichnung	Kommentar
1	4-1BB	TNFRSF9	TNF- Rezeptor
2	B7-H3		Immun-Checkpoint
3	B7-H4 VTCN1		Antigenpräsentierende Zellen
4	CD11b	Integrin Subunit α M	Integrin
5	CD11c	Integrin Subunit a X	Integrin
6	CD14		Monozyten
7	CD163		M2-Makrophagen
8	CD20		Oberflächenprotein B-Zelle
9	CD3		T-Zellrezeptor
10	CD44		Oberflächenprotein
11	CD45		Protein-Tyrosinphosphatase
12	CD45RO		Oberflächenmarker für die Gedächtnis-T-Zelle
13	CD56	Neural Cell Adhesion Molecule	Zell-Zell-Interaktion
14	CD66B	Carcinoembryonic Antigen- Related Cell Adhesion Molecule 8	Zelladhäsion
15	CD68		Makrophagen, Monozyten,
16	Histone H3	H3C1	Histon-Protein des Chromatin
17	HLA.DR		MHC-Klasse-II-Molekül

Tabelle 4: Übersicht des immuno-onkologischen Panels auf Protein-Ebene

18	ICOS CD278	Inducible T Cell Costimulator	Kostimulator der
			T-Zell-Aktivierung
19	Ki67	Marker Of Proliferation Ki-67	Zellproliferation, Zellzyklus
20	OX40L CD252		Kostimulator der
	TXGP1		T-Zell-Aktivierung
21	Pan-Zytokeratin		Zytoskelett
22	PD-1	Programmed Cell Death	Immun-Checkpoint
		Protein 1	Rezeptor des Liganden PD-L1
			und PD-L2
23	pS6	Ribosomal Protein S6	
24	STING	Stimulator Of Interferon	Transmembranesprotein
	TMEM173	Genes	
25	Tim-3		Immun-Checkpoint
26	VISTA	V-domain immunoglobulin	Immun-Checkpoint
		suppressor of T cell activation	

Tabelle 5: Übersicht des immuno-onkologischen Panels auf RNA-Ebene

Х	Abkürzung	Bezeichnung	Kommentar
1	AKT		Enzym
2	ARG1	Arginase 1	
3	B2M	β-2-Microglobulin	MHC-Klasse-I-Molekül
4	BATF3	Basic Leucine Zipper ATF-Like	Transkriptionsfaktor
		Transcription Factor 3	
5	BCL2		Apoptose
6	CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand	Chemokin
7	CCND1	Cyclin D1	Zellzyklus
8	CD27		Immun-Checkpoint
9	CD3E		T-Zell Rezeptor CD3
10	CD4		T- Lymphozyten
11	CD40		TNF- Rezeptor
12	CD40LG		Kostimulator der
			T-Zell-Aktivierung
13	CD47		Transmembranesprotein
14	CD68		Monozyten, Makrophagen
15	CD74		MHC-Klasse-II-Molekül
16	CD74		MHC-Klasse-II-Molekül
17	CD86		Ligand von CD38 und CTLA-4
18	CD8A		Glykoprotein auf zytoxischen
			T-Zellen

19	CMKLR1	Chemerin Chemokine-Like Receptor 1	Chemokin
20	CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	Zytokin
21	CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	Immun-Checkpoint
22	CTNNB1	β-Catenin	Zellzyklus
23	CXCL9	C-X-C Motif Chemokine Ligand 9	Chemokin
24	CXCR6	C-X-C Motif Chemokine Receptor 6	Chemokinrezeptor
25	DKK2	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 2	Modulator des Wnt- Signalweges
26	FAS	Fas Cell Surface Death Receptor	TNF Rezeptor
27	FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3	regulatorische T-Zellen
28	GZMB	Granzym B	Serinprotease
29	HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit α	Als Reaktion auf Hypoxie
30	HLA-DQA1	Major Histocompatibility Complex, Class ΙΙ, DQ α 1	MHC-Klasse-II-Molekül
31	HLA-DRB	Major Histocompatibility Complex, Class ΙΙ, DR β1	MHC-Klasse-II-Molekül
32 HLA-E Major Histocompatibilit Complex, Class I, E		Major Histocompatibility Complex, Class I, E	MHC-Klasse-I-Molekül
33	HLA.DRB		MHC-Klasse-II-Molekül
34	ICOSLG	Inducible T Cell Costimulator Ligand	Ligand von ICOS
35	IDO1	Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1	Enzym
36	IFNG	Interferon Gamma	Zytokin
37	IL12B	Interleukin 12B	Zytokin,
38	IL15	Interleukin 15	Zytokin
39	ITGAV	Integrin Subunit α V	Integrin
40	ITGB2	Integrin β2	Integrin
41	ITGB8	Integrin β8	Integrin
42	LAG3	Lymphocyte Activating 3	Immun-Checkpoint
43	LY6E	Lymphocyte Antigen 6 Family Member E	

44	Multi.KRT	KRT6A,6B,6C,7,10, 14,17,18,19	Intermediärfilament
45	NKG7	Natural Killer Cell Granule	
		Protein 7	
46	OAZ1	Ornithine Decarboxylase	Zellwachstum und Proliferation
		Antizyme 1	
47	pan-		Melanoyte
	Melanocyte		
48	pan.melanocyte		Melanozyten
49	PD-L1	Programmed Cell Death 1	Immun-Checkpoint
		Ligand 1	
50	PD-L2	Programmed Cell Death 1	Immun-Checkpoint
		Ligand 2	
51	PECAM-1	Platelet And Endothelial Cell	Thrombozyten-Endothelzellen-
		Adhesion Molecule 1	Adhäsionsmolekül
52	POLR2A		RNA Polymerase II Subunit A
53	PSMB10	Proteasome Subunit $\beta$ 10	Proteasom
54	PTEN		Phosphatase
55	RAB7A	Ras-related Protein Rab-7a	Vesikeltransport
56	RAB7A	Ras-related Protein Rab-7a	Vesikeltransport
57	SDHA	Succinate Dehydrogenase	Housekeeping Gene
		Complex Flavoprotein Subunit A	
58	STAT1	Signal Transducer And Activator	STAT Protein
		Of Transcription 1	
59	STAT2	Signal Transducer And Activator	Signaltrandsduktion
		Of Transcription 2	
60	STAT3		STAT Protein
61	TBX21	T-Box Transcription Factor 21	Wachstumsprozess
62	TIGIT	T Cell Immunoreceptor With Ig	Immun-Checkpoint-Rezeptor
		And ITIM Domains	
63	TNF	Tumornekrosefaktor	Zytokin
64	UBB	Ubiquitin B	
65	VEGFA	Vascular Endothelial Growth	Wachstumsfaktor
		Factor A	
66	β2-		MHC-Klasse-I-Molekül
	Mikroglobulin		

## 2.3 Auswertung und Statistik

Für die statistische Datenanalyse wurde die nSolver™ Analysis Software der Firma Nanostrings verwendet. Die Auswertung der Messungen und die Normalisierung erfolgten über die nSolver™ Software.

Die Messwerte wurden über folgende Housekeeping Gene normalisiert:

Housekeeping Gene
SDHA
UBB
OAZ1
POLR2A
RAB7A

Tabelle 6: Übersicht der Housekeeping Gene.

#### Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist ein exploratives Verfahren, mit dem Redundanzen in den Datensätzen entfernt werden, um Ähnlichkeiten zwischen den Daten zu visualisieren. Es werden somit die Variablen zu Hauptkomponenten zusammengefasst. Die Verteilung der Daten wird dann in ein Koordinatensystem eingetragen, dessen erste Achse die höchste Varianz der Daten angibt. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCA-Analyse zur Darstellung von Ähnlichkeiten innerhalb der Expressionen in einem Gewebe genutzt. (97)

#### Volcano Plot

Die differentiell exprimierten Protein- und RNA-Expressionen liegen als Volcano Plot vor. Der Volvano Plot dient dazu, die Expressionen und die signifikanten Veränderungen zu visualisieren. (98) Dabei sind die Expressionen logarithmisch entsprechend des Fold Changes und des p-Wertes aufgetragen.

Der logarithmische Fold Change (Logarithmus zur Basis 2) gibt das Expressionsverhältnis an. Eine Hochregulierung im Tumor gegenüber dem Stroma wird durch ein positives log2 Fold Change-Vorzeichen angezeigt, ein negatives Vorzeichen bedeutet dagegen eine Hochregulierung im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert  $\leq$  0,05 festgelegt. Die Korrektur erfolgte mit Hilfe der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

#### **Hierarchisches Clusterheatmap**

Die verschiedenen Expressionsunterschiede können zusammengefasst in Form Clusterheatmap einer hierarchischen grafisch dargestellt werden. Das hierarchische Clustering basiert darauf, dass die ähnlichsten Profile einander zugeordnet werden. Dabei wird immer die geringste Distanz zwischen zwei Clustern sukzessiv zu einem neuen Cluster vereinigt. Ähnliche Expressionsmuster liegen Für dann nah beieinander. (99) die Clusterheatmap wurde die Spearman-Korrelation verwendet.

#### Korrelationskoeffizient nach Pearson und die Regressionsgerade

Zur Untersuchung des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wurde eine Punktwolke erstellt. Je dichter die Variablen (Punkte) beieinander liegen, desto stärker ist der Zusammenhang. Mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten ,r' nach Pearson kann dieser Zusammenhang berechnet werden. Dieser Koeffizient, der einen Wert im Bereich von -1,00 und +1,00 annehmen kann, lässt sich für die Beurteilung in mehrere Gruppen einteilen:

r: +/- 0,90–1,00 – sehr starke Korrelation +/- 0,70–0,90 – starke Korrelation +/- 0,50–0,70 – moderate Korrelation +/- 0,30–0,00 – schwache Korrelation

Neben dem Koeffizienten nach Pearson liegt auch eine Regressionsgerade vor. Die Variablen liegen verstreut um diese Regressionsgerade; je näher sie an ihr liegen, desto höher ist der Zusammenhang. (100–102)

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Region-of-Interest

In jeder Probe des TMA wurde zunächst eine ROI ausgewählt, die Tumor- und umgebendes Stromagewebe enthält. In einigen Proben des TMAs wurden zwei ROIs nach gleichem Muster ausgesucht, um die Variation der Expressionsmuster innerhalb eines Kompartiment an verschiedenen Stellen evaluieren zu können.



Abbildung 3: Ausgewählte ROIs in drei Proben des TMAs.



Abbildung 4: Eine ROI bestehend aus Tumor- und Stromagewebe.

3.2 Vergleichbarkeit der generellen Expressionsprofile von untersuchten Markern auf Protein- und RNA-Ebene

Bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA = Principal component analysis) handelt es sich um eine mathematische Methode, um Muster mit ähnlichen Qualitäten in Datensätzen zu finden. So werden Redundanzen zur Aufspürung von Expressionen mit ähnlichen Signaturen entfernt. Es ermöglicht die Beurteilung, ob vergleichbare generelle Protein- oder RNA-Expressionsprofile der untersuchten Marker in unterschiedlichen Proben oder Gruppen vorliegen. (103,104)

Jeder Punkt in der PCA repräsentiert das generelle Expressionsmuster einer einzelnen Probe auf Protein- oder RNA-Ebene. Expressionen im Stroma sind grün gefärbt, während Expressionen im Tumor blau gekennzeichnet sind. Der Abbildung 5 sind die Ergebnisse bezüglich der Protein-Expressionen zu entnehmen. In der Abbildung 6 werden die Resultate hinsichtlich der RNA-Expressionen der PCA dargestellt.

Der PCA ist zu entnehmen, dass die generellen Expressionsmuster der gewählten Marker im Tumorgewebe sowohl auf Protein-Ebene als auch auf RNA-Ebene eine geringe Streuung zwischen den einzelnen Proben aufweisen und die einzelnen Proben gut clustern. Dieses Clustering scheint hinsichtlich der Protein-Expression der Marker etwas stärker ausgeprägt zu sein. Somit zeigen die unterschiedlichen Patientenproben vergleichbare generelle Expressionsmuster der untersuchten Marker im Tumor.

Die Expressionsmuster der gewählten Marker im Stroma lassen im Vergleich dazu sowohl auf Protein-Ebene als auch auf RNA-Ebene eine etwas breitere Streuung mit einem weniger deutlichen Clustering erkennen. Die Streuung ist auf Protein-Ebene etwas stärker ausgeprägt. Somit weisen die unterschiedlichen Patientenproben eine etwas höhere Variabilität im generellen Expressionsmuster der untersuchten Marker im Stroma auf.

Zusammenfassend zeigt der visuelle Vergleich zwischen Tumor- und Stromagewebe insgesamt ein gutes Clustering der jeweiligen Gewebe, somit lässt sich eine deutliche Differenzierung dieser beiden Gewebetypen in der PCA nachweisen.





Abbildung 5: PCA-Plot der Protein-Expression.



Abbildung 6: PCA-Plot der RNA-Expression.

3.3 Untersuchung der Expressionsprofile der immuno-onkologischen Marker auf Protein- und RNA-Ebene bei Patienten ohne neoadjuvante Vorbehandlung

In einem ersten Schritt wurde die Expression der immuno-onkologischen Marker auf Protein- und RNA-Ebene in Operationspräparaten von Patienten ohne vorangegangene neoadjuvante Vorbehandlung gemessen. Diese Proben entsprachen somit nativen Tumor- und Stromaproben. Die Ergebnisse der quantitativen Messung wurden als Volcano-Plot (Abbildung 7 und 8) dargestellt. Dabei wurden die Expressionen der untersuchten Marker im Tumor- und Stromagewebe verglichen.

Es zeigten sich in der Tat signifikante Unterschiede in der Expression mehrerer Marker auf Protein- und RNA-Ebene zwischen Tumor- und Stromagewebe. Die Tabellen 7 und 8 präsentieren eine Zusammenfassung der im Stroma (Tabelle 7) und im Tumor (Tabelle 8) überexprimierten immuno-onkologischen Marker auf Protein-Ebene. In Tabelle 9 (überexprimierte Marker im Stroma) und 10 (überexprimierte Marker im Tumor) sind die entsprechenden Ergebnisse auf RNA-Ebene dargestellt.

Die hierbei im Stroma gegenüber dem Tumor am stärksten überexprimierten Marker auf Protein-Ebene beinhalteten beispielsweise CD4, CD3, ICOS.CD278, CD11c und CD45RO. Im Tumor wurden vor allem Pan-Zytokeratin, Ki67 und β-Catenin höher exprimiert als im Stroma.

Auf RNA-Ebene zeigten sich im Stroma CD4, ITGB2, PECAM1, CD45, CSF1R, HLA.DQA1 und CD11c als am stärksten überexprimiert gegenüber dem Tumorgewebe. Im Tumor hingegen fand sich eine signifikant erhöhte Expression von EPCAM, Multi.KRT und UBB gegenüber dem Stroma.

Ein genauerer Blick auf die unterschiedlichen Expressionen der verschiedenen Marker im Tumor und Stroma verdeutlicht, dass die als differentiell exprimierten Marker unterschiedlichen funktionellen Gruppen zugeordnet werden können. So können beispielsweise die im Stroma überexprimierten Marker auf Protein-Ebene CD4, CD3, CD45RO der T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort zugeordnet werden, ICOS.CD278 der T-Zell-Aktivierung und CD11c der Zelladhäsion.

Auf RNA-Ebene zeigt sich im Stroma ein ähnliches Bild. So kann hier die Überexpression von CD4 der T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort, ITGB2, PECAM1 und CD11c der Zelladhäsion, CD45 der T-Zell-Aktivierung, CSF1R den Zytokinen und HLA.DQA1 der Antigenpräsentation.

Zusammenfassend finden sich im Stroma sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene eine signifikant erhöhte Expression von Markern, welche eine entscheidende Rolle bei der Antigenpräsentation, B-Zell-vermittelten Immunantwort, Immun-Checkpoints, Makrophagen, pro-tumoral vermittelte Effektoren, T-Lymphozytenvermittelten Immunantwort, immunsuppressive Wirkung, anti-tumoral vermittelte Effektoren, T-Zell-Aktivierung, Beteiligung an der Apoptose, Zytokine und Zelladhäsion spielen.

Bei der Betrachtung der überexprimierten Marker im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe wird erkenntlich, dass die stärksten signifikantesten überexprimierten Marker auf Protein-und RNA-Ebene zum größten Teil eine antitumorale Antwort vermitteln. Im Tumorgewebe sind dagegen nur Marker exprimiert, welche eine pro-tumorale Wirkung hervorrufen.



im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe hochregulierte Expressionen ← log2 Fold Change → im Tumor gegenüber dem Stromagewebe hochregulierte Expressionen

Abbildung 7: Darstellung der quantitativen Messung der Protein-Expressionen im Volcano-Plot.



im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe hochregulierte Expressionen 🗲 log2 Fold Change 🗲 im Tumor gegenüber dem Stromagewebe hochregulierte Expressionen

Abbildung 8: Darstellung der quantitativen Messung der RNA-Expressionen im Volcano-Plot.

Abbildung 7 und 8: Auf der x-Achse liegt der logarithmische Fold Change, durch den die hochregulierten Expressionen eingeteilt werden. Expressionen, die im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe hochreguliert sind, liegen im negativen linken Bereich. Expressionen, die im Tumorgewebe gegenüber dem Stroma erhöht sind, finden sich im positiven rechten Bereich. Auf der y-Achse wurde die Signifikanz logarithmisch eingetragen. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 festgelegt.

Tabelle 7: Übersicht der überexprimierten Marker auf Protein-Ebene im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe.

Gruppe	Protein-	Gen	Kommentar	Wirkung
	Expression			
Antigen-	HLA.DR	CD74	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation			Molekül	suppressor (105)

B-Zell-vermittelte	CD20	MS4A1	Oberflächen-	Onkogen (106)
Immunantwort			protein B-Zelle	

Immun-	VISTA	VSIR	Immun-	Onkogen (107)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	B7-H3	CD276	Immun-	Onkogen (108)
Checkpoint			Checkpoint	

immun-	FoxP3	FoxP3	regulatorische T-	Onkogen (109)
suppressive			Zelle	
Wirkung				

Makrophagen	CD68	CD68	M1- und M2-	
			Makrophagen,	
			Monozyten (110)	
M2-	CD163	CD163	M2-	Onkogen (111)
Makrophagen			Makrophagen	
Monozyten	CD14	CD14	Monozyten	Onkogen (112)

pro-tumoral	CD44	CD44	Glykoprotein	Onkogen (113)
vermittelte				
Effektoren				

T-Lymphozyten-	CD4	CD4	T-Lymphozyten	Tumor-
vermittelte				suppressor (69)
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD3	CD3D,CD3E,CD	T-Zell-Rezeptor	Tumor-
vermittelte		3G		suppressor (114)
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD45RO	PTPRC	Gedächtnis-T-	Tumor-
vermittelte			Zelle	suppressor (115)
Immunantwort				

T-Lymphozyten- vermittelte Immunantwort	CD8A	CD8A	Glykoprotein auf zytoxischen T- Zellen	Tumor- suppressor (116)
anti-tumoral	PTEN	PTEN	Phosphatase	Tumor-

anti-tumorai	PIEN	PIEN	Phosphatase	Tumor-
vermittelte				suppressor (117)
Effektoren				

T-Zell-	ICOS.CD278	ICOS	Kostimulator der	Tumor-
Aktivierung			T-Zell-	suppressor (118)
			Aktivierung	
T-Zell-	CD45	PTPRC	Protein-Tyrosin-	Tumor-
Aktivierung			phosphatase	suppressor (119)
T-Zell-	OX40L.CD252	TNFSF4	Kostimulator der	Tumor-
Aktivierung			T-Zell-	suppressor (120)
			Aktivierung	

Zelladhäsion	STING.TMEM17	TMEM173	Trans-	Tumor-
	3		membranes-	suppressor (121)
			protein	
Zelladhäsion	CD11c	ITGAX	Integrin	Tumor-
				suppressor (122)

Tabelle 8: Übersicht der überexprimierten Marker auf Protein-Ebene im Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe. Die kursiv gekennzeichneten Protein-Expressionen werden nach neoadjuvanter Vorbehandlung nicht mehr signifikant exprimiert.

Gruppe	Protein-	Gen	Kommentar	Wirkung
	Expression			
pro-tumoral	Pan-Zytokeratin	KRT1, 2, 3, 5, 6A,	Zytoskelett	Onkogen (91)
vermittelte		6B, 8, 10, 14,		
Effektoren		16,19		
pro-tumoral	Ki67	MKI67	Zellzyklus	Onkogen (123)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	β -Catenin	CTNNB1	Zellzyklus	Onkogen (124)
vermittelte				
Effektoren				

Tabelle 9: Übersicht der überexpremierten Marker auf RNA-Ebene im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe. Die kursiv gekennzeichneten RNA-Expressionen werden nach neoadjuvanter Vorbehandlung nicht mehr signifikant exprimiert.

Gruppe	RNA-Expression	Gen	Kommentar	Wirkung
Antigen-	HLA.DQA1	HLA.DQA1	HLA.DQA1	Tumor-
präsentation				suppressor (125)
Antigen-	HLA.DRB	HLA-DRB-1, -3, -	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation		4, -5	Moleküle	suppressor (126)
Antigen-	CD74	CD74	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation			Molekül	suppressor (127)
Antigen-	BATF3	BATF3	Transkriptions-	Tumor-
präsentation			faktor	suppressor
				(128,129)
Antigen-	B2M	B2M	MHC-Klasse-I-	Tumor-
präsentation			Komplex	suppressor und
				Onkogen
				(130,131)
Antigen-	HLA.E	HLA.E	MHC-Klasse-I-	Onkogen
präsentation			Komplex	(132,133)

Beteiligung an	BCL2	BCL2	Bcl-2 Protein	Tumor-
der Apoptose				suppressor (134)

B-Zell-vermittelte	CD20	MS4A1	Oberflächen-	Onkogen (106)
Immunantwort			protein	
			B-Zelle	

Divers	pan.melanocyte	PMEL,S100B,	Melanozyten	
		SOX10	(135)	
Divers	POLR2A	POLR2A	RNA-	
			Polymerase-II-	
			Komplex (136)	
Divers	PSMB10	PSMB10	Proteasom (137)	

Immun-	TIGIT	TIGIT	Immun-	Onkogen (138)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	Tim-3	HAVCR2	Immun-	Onkogen (139)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	CTLA4	CTLA4	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	

Immun-	PD-L2	PDCD1LG2	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	LAG3	LAG3	Immun-	Onkogen (140)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	VISTA	VSIR	Immun-	Onkogen (107)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	PD-L1	CD274	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	PD-1	PDCD1	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	B7.H3	CD276	Immun-	Onkogen (108)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	CD27	CD27	Immun-	Onkogen (141)
Checkpoint			Checkpoint	

immun-	FoxP3	FoxP3	regulatorische	Onkogen (109)
suppressive			T-Zellen	
Wirkung				

Makrophagen	CD68	CD68	M1- und M2-	
			Makrophagen,	
			Monozyten (110)	
M2-	ARG1	ARG1	Arginase 1	Onkogen (142)
Makrophagen				

pro-tumoral	STAT2	STAT2	STAT-Familie	Tumor-
vermittelte				suppressor (143)
Effektoren				
pro-tumoral	IDO.1	IDO1	Enzym	Onkogen (144)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	TBX21	TBX21	Transkriptions-	Onkogen (145)
vermittelte			faktor	
Effektoren				
pro-tumoral	STAT1	STAT1	STAT-Familie	Tumor-
vermittelte				suppressor (146)
Effektoren				
pro-tumoral	AKT1	AKT1	Enzym	Onkogen (147)
vermittelte				
Effektoren				

pro-tumoral	STAT3	STAT3	STAT-Familie	Onkogen (148)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	CD44	CD44	Glykoprotein	Onkogen (113)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	KI67	MKI67	Zellzyklus	Onkogen
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	RAB7A	RAB7A	Vesikeltransport	Onkogen (149)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	CCND1	CCND1	Zellzyklus	Onkogen (150)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	DKK2	DKK2	Dikkopf-Familie	Onkogen (151)
vermittelte				
Effektoren				

	001	CD4	I-Lymphozyten	l'umor-
vermittelte				suppressor
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD3E	CD3E	T-Zell-Rezeptor	Tumor-
vermittelte				suppressor
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	NKG7	NKG7	NK-Zelle	Tumor-
vermittelte				suppressor (152)
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD8A	CD8A	Glykoprotein auf	Tumor-
vermittelte			zytoxischen T-	suppressor (116)
Immunantwort			Zellen	
T-Lymphozyten-	GZMB	GZMB	Granzym B	Tumor-
vermittelte				suppressor (153)
Immunantwort				

anti-tumoral	OAZ1	OAZ1	Enzym	Tumor-
vermittelte				suppressor (154)
Effektoren				

anti-tumoral	PTEN	PTEN	Phosphatase	Tumor-
vermittelte				suppressor
Effektoren				

T-Zell-	CD45	PTPRC	Protein-Tyrosin-	Tumor-
Aktivierung			phosphatase	suppressor
T-Zell-	CD86	CD86	Ligand von CD28	Tumor-
Aktivierung			und	suppressor und
			CTLA-4	Onkogen (155)
T-Zell-	CD40LG	CD40LG	Kostimulator der	Tumor-
Aktivierung			T-Zell-	suppressor (156)
			Aktivierung	
T-Zell-	ICOSLG	ICOSLG	Ligand von ICOS	Tumor-
Aktivierung				suppressor (118)

Zelladhäsion	ITGB2	ITGB2	Integrin	Tumor-
				suppressor (157)
Zelladhäsion	PECAM-1	PECAM-1	Thrombozyten-	Onkogen (158)
			Endothel-	
			zellen-	
			Adhäsions-	
			molekül	
Zelladhäsion	CD11b	ITGAM	Integrin	Tumor-
				suppressor (157)
Zelladhäsion	ICAM1	ICAM1	Integrin	Tumor-
				suppressor (159)
Zelladhäsion	ITGAV	ITGAV	Integrin	Onkogen (160)
Zelladhäsion	CD47	CD47	Transmembran-	Onkogen (161)
			protein	
Zelladhäsion	CD11c	ITGAX	Integrin	Tumor-
				suppressor (159)

Zytokin	CSF1R	CSF1R	Zytokin	Onkogen (162)
Zytokin	CXCL9	CXCL9	Chemokin	Tumor-
				suppressor (163)
Zytokin	CMKLR1	CMKLR1	Chemokin	Tumor-
				suppressor (164)
Zytokin	HIF1A	HIF1A	Transkriptions-	Onkogen (165)
			faktor	

Zytokin	X41.BB	4-1BB	Kostimulator der	Tumor-
			T-Zell-	suppressor (166)
			Aktivierung	
Zytokin	CXCR6	CXCR6	Chemokin-	Tumor-
			rezeptor	suppressor (167)
Zytokin	CCL5	CCL5	Chemokin	Onkogen (168)
Zytokin	IL6	IL6	Interleukin 6	Tumor-
				suppressor und
				Onkogen (169)
Zytokin	IL12B	IL12B	Interleukin	Tumor-
				suppressor (170)
Zytokin	IFNAR1	IFNAR1	Interferon α/β	Onkogen (171)
			Rezeptor -1	
Zytokin	CXCL10	CXCL10	Chemokin	Onkogen (172)
Zytokin	IL15	IL15	Interleukin	Tumor-
				suppressor (173)
Zytokin	CD40	CD40	TNF-	Tumor-
			Superfamilie	suppressor (174)
Zytokin	FAS	FAS	TNF-	Tumor-
			Superfamilie	suppressor (175)
Zytokin	TNF	TNF	TNF-	Tumor-
			Superfamilie	suppressor/
				Onkogen (176)
Zytokin	IFNG	IFNG	Interferon-	Tumor-
			Gamma	suppressor (177)
Zytokin	IFNGR1	IFNGR1	Interferon-	Tumor-
			Gamma-	suppressor (178)
			Rezeptor 1	

Tabelle 10: Übersicht der überexpremierten Marker auf RNA-Ebene im Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe. Die kursiv gekennzeichneten RNA-Expressionen werden nach der neoadjuvanten Vorbehandlung nicht mehr signifikant exprimiert.

Gruppe	RNA-Expression	Gen	Kommentar	Wirkung
pro-tumoral	EPCAM	EpCAM	Zelladhäsions-	Onkogen (179)
vermittelte			molekül	
Effektoren				
pro-tumoral	Multi.KRT	KRT6A,6B,6C,7,	Intermediär-	Onkogen (180)
vermittelte		10, 14,17,18,19	filament	
Effektoren				

pro-tumoral	UBB	UBB, UBBP4	Ubiquitin B	Onkogen (181)
vermittelte				
Effektoren				

3.4 Untersuchung der Expressionsprofile der immuno-onkologischen Marker auf Protein- und RNA-Ebene bei Patienten mit neoadjuvanter Vorbehandlung

In einem weiteren Schritt wurden die immuno-onkologischen Marker auf Proteinund RNA-Ebene ebenfalls bei Patienten nach einer neoadjuvanten Vorbehandlung analysiert. Hierbei wurden ebenso die Operationspräparate verwendet. Somit entsprechen die Proben neoadjuvant vorbehandeltem Gewebe. Die Ergebnisse der quantitativen Messung wurden als Volcano-Plot (Abbildungen 9 und 10) dargestellt. Dabei wurden die Expressionen der untersuchten Marker im Tumor- und Stromagewebe verglichen.

Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression mehrerer Marker auf Protein- und RNA-Ebene zwischen Tumor- und Stromagewebe. Die Tabellen 11 und 12 stellen eine Zusammenfassung der im Stroma (Tabelle 11) und im Tumor (Tabelle 12) überexpremierten immuno-onkologischen Marker auf Protein-Ebene dar; in Tabelle 13 (überexpremierte Marker im Stroma) und Tabelle 14 (überexpremierte Marker im Tumor) sind die entsprechenden Ergebnisse auf RNA-Ebene dargestellt.

Im Vergleich zu den Proben ohne neoadjuvante Vorbehandlung zeigte sich bei den hier analysierten Präparaten eine signifikant erhöhte Expression im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe auf Protein-Ebene von zwölf weiteren Proteinen. Zu den Biomarkern auf Protein-Ebene gehören: GZMB, pS6, Histone.H3, BCL2, AKT, P.AKT, IDO.1, Rabbit.IgG, PD-1, CD66B, STAT3 und  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Tabelle 11, kursiv gekennzeichnet). Im Tumor wurde im Vergleich zum Stromagewebe einzig Pan-Cytokeratin überexpremiert; die anderen in unbehandeltem Gewebe detektierten überexpremierten Marker waren hier nicht mehr nachweisbar.

Auf RNA-Ebene führte die neoadjuvante Vorbehandlung im Stroma hingegen zu einer zahlenmäßigen Reduktion der als signifikant überexpremiert detektierten Biomarker in den nicht vorbehandelten Proben. Zu den 18 Biomarkern, die auf RNA- Ebene bei neoadjuvanter Vorbehandlung nicht mehr als überexpremiert nachweisbar sind, gehören: OAZ1, B7.H3, POLR2A, CD20, IDO.1, ITGAV, STAT1, B2M, IFNG, HLA.E, IFNGR1, AKT1, STAT3, CD44, KI67, RAB7A, CCND1 und CD47 (Tabelle 9, kursivmarkiert). Ähnlich wie auf Protein-Ebene fand sich hier im Tumor ebenfalls nur noch ein einziger Marker überexpremiert (Multi.KRT).

Die detaillierte Analyse der Ergebnisse der Proben nach neoadjuvanter Vorbehandlung zeigte zudem zwei Besonderheiten: zum einen fand sich generell eine niedrigere Expression der Marker auf Protein- und RNA-Ebene in beiden Geweben im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Proben. Zum anderen hat sich das Verhältnis zwischen den erhöht expremierten pro-tumoralen Markern und den anti-tumoralen Markern im Stromagewebe auf RNA-Ebene und auf Protein-Ebene verändert. Auf RNA-Ebene liegen in den vorbehandelten Proben vermehrt erhöhte Expressionen von Markern vor, die anti-tumorale Effekte vermitteln. Auf Protein-Ebene kommen allerdings mehr Marker mit pro-tumoraler Funktion vor.



im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe hochregulierte Expressionen 🗲 log2 Fold Change 🔶 im Tumor gegenüber dem Stromagewebe hochregulierte Expressionen

Abbildung 9: Darstellung der quantitativen Messung der Protein-Expressionen nach neoadjuvanter Vorbehandlung im Volcano-Plot.



im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe hochregulierte Expressionen 🗲 log2 Fold Change ᢣ im Tumor gegenüber dem Stromagewebe hochregulierte Expressionen

Abbildung 10: Darstellung der quantitativen Messung der RNA-Expressionen nach neoadjuvanter Vorbehandlung im Volcano-Plot.

Abbildung 9 und 10: Auf der x-Achse liegt der logarithmische Fold Change, durch den die hochregulierten Expressionen eingeteilt werden. Expressionen, die im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe hochreguliert sind, liegen im negativen linken Bereich. Expressionen, die im Tumorgewebe gegenüber dem Stroma erhöht sind, finden sich im positiven rechten Bereich. Auf der y-Achse wurde die Signifikanz logarithmisch eingetragen. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 festgelegt.

Tabelle 11: Übersicht der überexpremierten Marker auf Protein-Ebene im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung. Die kursiv gekennzeichneten Protein-Expressionen sind in der neoadjuvanten Vorbehandlung hinzugekommen.

Gruppe	Protein-	Gen	Kommentar	Wirkung
	Expression			
Antigen-	β <sub>2</sub> -Mikroglobulin	β2M	MHC-Klasse-I-	Onkogen (131)
präsentation			Molekül	
Antigen-	HLA.DR	CD74	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation			Molekül	suppressor

Beteiligung a	n	BCL2	BCL2	Bcl-2 Protein	Tumor-
der Apoptose					suppressor (182)

B-Zell-vermittelte	CD20	MS4A1	Oberflächen-	Onkogen
Immunantwort			protein B-Zelle	(183,184)

Divers	Rabbit.IgG	 Negativkontrolle	

Immun-	VISTA	VSIR	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	B7.H3	CD276	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	PD-1	PDCD1	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	

immun-	FoxP3	FoxP3	regulatorische T-	Onkogen (109)
suppressive			Zellen	
Wirkung				

Makrophagen	CD68	CD68	M1 und M2-	
			Makrophagen,	
			Monozyten (110)	
M2-	CD163	CD163	M2-	Onkogen (111)
Makrophagen			Makrophagen	
Monozyten	CD14	CD14	Monozyten	Onkogen (112)

pro-tumoral	CD44	CD44	Glykoprotein	Onkogen (113)
vermittelte				
Effektoren				

pro-tumoral	pS6	RPS6	Ribosomal	Onkogen (185)
vermittelte			Protein S6	
Effektoren				
pro-tumoral	Histone.H3	HIST1H3A	Histon-Protein	Onkogen (186)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	AKT	AKT1	Enzym	Onkogen (187)
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	P.AKT	AKT1	Phospho. Akt	Onkogen
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	IDO.1	IDO.1	Enzym	Onkogen
vermittelte				
Effektoren				
pro-tumoral	CD66B	CEACAM8	Zelladhäsions-	Onkogen (21)
vermittelte			molekül	
Effektoren				
pro-tumoral	STAT3	STAT3	STAT-Familie	Onkogen
vermittelte				
Effektoren				

T-Lymphozyten-	CD4	CD4	T-Lymphozyten	Tumor-
vermittelte				suppressor (69)
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD8A	CD8A	Glykoprotein auf	Tumor-
vermittelte			zytoxischen	suppressor (116)
Immunantwort			T-Zellen	
T-Lymphozyten-	CD3	CD3D,CD3E,CD	T-Zell-Rezeptor	Tumor-
vermittelte		3G		suppressor
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD45RO	PTPRC	Gedächtnis-T-	Tumor-
vermittelte			Zelle	suppressor (115)
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	GZMB	GZMB	Granzym B	Tumor-
vermittelte				suppressor
Immunantwort				

anti-tumoral	PTEN	PTEN	Phosphatase	Tumor-
vermittelte				suppressor
Effektoren				

T-Zell-	CD45	PTPRC	Protein-Tyrosin-	Tumor-
Aktivierung			phosphatase	suppressor
T-Zell-	ICOS.CD278	ICOS	Kostimulator der	Tumor-
Aktivierung			T-Zell-	suppressor (118)
			Aktivierung	
T-Zell-	OX40L.CD252	TNFSf4	Kostimulator der	Tumor-
Aktivierung			T-Zell-	suppressor
			Aktivierung	

Zelladhäsion	CD11c	ITGAX	Integrin	Tumor-
				suppressor
Zelladhäsion	STING.TMEM17	TMEM173	Transmem-	Tumor-
	3		branesprotein	suppressor

Tabelle 12: Übersicht der überexpremierten Marker auf Protein-Ebene im Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung.

Gruppe	Protein-	Gen	Kommentar	Wirkung
	Expression			
pro-tumoral	Pan-Zytokeratin	KRT1, 2, 3, 5, 6A,	Zytoskelett	Onkogen
vermittelte		6B, 8, 10, 14,		
Effektoren		16,19		

Tabelle 13: Übersicht der überexprimierten Marker auf RNA-Ebene im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung

Gruppe	RNA-	Gen	Kommentar	Wirkung
	Expressionen			
Antigen-	HLA.DQA1	HLA.DQA1	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation			Komplex	suppressor
Antigen-	HLA.DRB	HLA-DRB-1, -3, -	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation		4, -5	Moleküle	suppressor (188)
Antigen-	CD74	CD74	MHC-Klasse-II-	Tumor-
präsentation			Molekül	suppressor

Beteiligung an	BCL2	BCL2	Bcl-2 Protein	Tumor-
der Apoptose				suppressor

Divers	pan.melanocyte	PMEL,S100B,	Melanozyten	
		SOX10		
Divers	PSMB10	PSMB10	Proteasom	

Immun-	TIGIT	TIGIT	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	Tim3	HAVCR2	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	CTLA4	CTLA4	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	PD-L2	PDCD1LG2	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	PD-1	PDCD1	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	VISTA	VSIR	Immun-	Onkogen (107)
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	LAG3	LAG3	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	PD-L1	CD274	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	
Immun-	CD27	CD27	Immun-	Onkogen
Checkpoint			Checkpoint	

immunsuppressi	FoxP3	FoxP3	regulatorische	Onkogen
ve Wirkung			T-Zellen	

Makrophagen	CD68	CD68	M1- und M2-	
			Makrophagen,	
			Monozyten (110)	

pro-tumorale	DKK2	DKK2	Dickkopf-Familie	Onkogen
Wirkung				
pro-tumoral	STAT2	STAT2	STAT-Familie	Tumor-
Wirkung				suppressor
pro-tumorale	TBX21	TBX21	Transkriptions-	Onkogen
Wirkung			faktor	
pro-tumorale	ARG1	ARG1	Arginase 1	Onkogen
Wirkung				

# 3 ERGEBNISSE

pro-tumorale	BATF3	BATF3	Transkriptions-	Tumor-
Wirkung			faktor	suppressor

T-Lymphozyten-	CD3E	CD3E	T-Zell-Rezeptor	Tumor-
vermittelte				suppressor
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD4	CD4	T-Lymphozyten	Tumor-
vermittelte				suppressor (69)
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	NKG7	NKG7	NK-Zelle	Tumor-
vermittelte				suppressor
Immunantwort				
T-Lymphozyten-	CD8A	CD8A	Glykoprotein auf	Tumor-
vermittelte			zytoxischen	suppressor (116)
Immunantwort			T-Zellen	
T-Lymphozyten-	GZMB	GZMB	Granzym B	Tumor-
vermittelte				suppressor
Immunantwort				

Tumor-	PTEN	PTEN	Phosphatase	Tumor-
suppressor				suppressor (117)

T-Zell-	CD45	PTPRC	Protein-Tyrosin-	Tumor-
Aktivierung			phosphatase	suppressor
T-Zell-	CD40LG	CD40LG	Kostimulator der	Tumor-
Aktivierung			T-Zell-	suppressor
			Aktivierung	
T-Zell-	CD86	CD86	Ligand von CD28	Tumor-
Aktivierung			und CTLA-4	suppressor und
				Onkogen
T-Zell-	ICOSLG	ICOSLG	Ligand von ICOS	Tumor-
Aktivierung				suppressor

Zelladhäsion	CD11c	ITGAX	Integrin	Tumor-
				suppressor
Zelladhäsion	CD11b	ITGAM	Interleukin	Tumor-
				suppressor
Zelladhäsion	ITGB2	ITGB2	Integrin	Tumor-
				suppressor

Zelladhäsion	PECAM-1	PECAM-1	Thrombozyten-	Onkogen
			Endothel-	
			zellen	
			Adhäsions-	
			molekül	
Zelladhäsion	ICAM1	ICAM1	Integrin	Tumor-
				suppressor

Zytokin	CSF1R	CSF1R	Zytokin	Onkogen	
Zytokin	CXCL10	CXCL10	Chemokin	Onkogen	
Zytokin	CCL5	CCL5	Chemokin	Onkogen	
Zytokin	CMKLR1	CMKLR1	Chemokin	Tumor-	
				suppressor	
Zytokin	CXCR6	CXCR6	Chemokin-	Tumor-	
			rezeptor	suppressor	
Zytokin	HIF1A	HIF1A	Transkriptions-	Onkogen	
			faktor		
Zytokin	CD40	CD40	TNF-	Tumor-	
			Superfamilie	suppressor	
Zytokin	CXCL9	CXCL9	Chemokin	Tumor-	
				suppressor	
Zytokin	FAS	FAS	TNF-	Tumor-	
			Superfamilie	suppressor	
Zytokin	IFNAR1	IFNAR1	Interferon α/β	Onkogen	
			Rezeptor -1		
Zytokin	IL15	II15	Interleukin	Tumor-	
				suppressor	
Zytokin	TNF	TNF	TNF-	Tumor-	
			Superfamilie	suppressor/	
				Onkogen	
Zytokin	IL12B	IL12B	Interleukin	Tumor-	
				suppressor	
Zytokin	X41.BB	4-1BB	Kostimulator der	Tumor-	
			T-Zell-	suppressor	
			Aktivierung		
Zytokin	IL6	IL6	Interleukin 6	Tumor-	
				suppressor und	
				Onkogen	

Tabelle 14: Übersicht der überexprimierten Marker auf RNA-Ebene im Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung

Gruppe	RNA-	Gen	Kommentar	Wirkung
	Expression			
pro-	Multi.KRT	KRT6A,6B,6C,7,10, 14,17,18,19	Intermediärfilament	Onkogen
tumoral				
vermittelte				
Effektoren				

3.5 Intratumorale Vergleichbarkeit der Expressionsprofile auf Protein- und RNA-Ebene innerhalb eines Präparates im Tumor und Stroma

Bei insgesamt fünf nicht vorbehandelten Proben wurden jeweils zwei repräsentative ROIs ausgewählt (Abbildung 11). Zweck dieser zweifachen Auswahl von ROIs innerhalb einer Probe war die Klärung der Frage, ob das Expressionsmuster auf Protein- und RNA-Ebene an unterschiedlichen Stellen im Tumor- und Stromagewebe in einer Gewebeprobe vergleichbar ist und ob somit die Entnahme einer Probe durch Biopsie an einer Stelle eine verlässliche Auskunft über die Expressionsmuster der Biomarker im gesamten Gewebe geben kann.



Abbildung 11: Ein Präparat mit zwei ausgewählten ROIs.

3.5.1 Vergleichbarkeit der Expressionsprofile innerhalb eines Präparates auf Protein-Ebene im Tumor- und Stromagewebe

In der Abbildung 12 ist die exemplarische grafische Darstellung der Expression aller untersuchten Biomarker auf Protein-Ebene in jeweils zwei ROIs innerhalb einer Probe im Tumor und Stroma zu entnehmen. Die beiden Achsen (log2 HK) geben hierbei die Expression der Marker in den jeweiligen ROIs an. In allen fünf Proben zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den Expressionen der jeweiligen Marker der beiden ROIs (Korrelationskoeffizient r zwischen 0,79 und 0,90).





Abbildung 12: Vergleich der Expressionen der Biomarker auf Protein-Ebene im Tumor- und Stromagewebe in jeweils zwei ROIs derselben Probe.

Die Expressionen der Marker werden in log2 HK angegeben. In jeder Grafik wird neben der Signifikanz auch der Korrelationskoeffizient genannt, der zwischen 0,79 und 0,90 liegt. Es ist daher von einer starken Korrelation zwischen den Proben auszugehen.

3.5.2 Vergleichbarkeit der Expressionsprofile innerhalb eines Präparates auf RNA-Ebene im Tumor- und Stromagewebe

In der Abbildung 13 ist die grafische Darstellung der Expression aller untersuchten Biomarker auf RNA-Ebene in jeweils zwei ROIs derselben Probe zu entnehmen. Die beiden Achsen (log2 HK) geben hierbei die Expression der Marker in den jeweiligen ROIs an. In drei Proben Probe 7/8, Probe 12/13 und Probe 22/23 zeigte sich wiederum eine linear starke Korrelation zwischen den Expressionen der jeweiligen Marker der beiden ROIs (Korrelationskoeffizient r zwischen 0,83 und 0,87). In zwei Proben liegt der Korrelationskoeffizient r bei 0,62 (Probe 2/3) und 0,66 (Probe 15/16), was einer moderaten Korrelation entspricht.





Abbildung 13: Vergleich der Expressionen der Biomarker auf RNA-Ebene im Tumor- und Stromagewebe in jeweils zwei ROIs derselben Probe.

Die Expressionen der Marker werden in log2 HK angegeben. In jeder Grafik wird neben der Signifikanz auch der Korrelationskoeffizient genannt, der in den Proben 7/8, 12/13 und 22/23 zwischen 0,83 und 0,87 liegt. Es ist daher von einer starken Korrelation zwischen den Proben auszugehen. In den restlichen Proben liegt der Korrelationskoeffizient r bei 0,62 und 0,66, was einer moderaten Korrelation entspricht.

### 3.6 Korrelation der immuno-onkologischen Marker mit klinischen Daten

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Expressionen der immunoonkologischen Biomarker auf Protein- und RNA-Ebene in beiden Geweben mit klinischen Parametern zu analysieren, erfolgte ein Unsupervised Clustering, das mit Hilfe einer Cluster Heatmap (Abbildung 14) dargestellt wurde.

Sowohl für unbehandelte als auch für neoadjuvant vorbehandelte Proben zeigte sich ein deutliches Clustering der Proben auf Protein- und RNA-Ebene hinsichtlich der Unterscheidung des Gewebes (Tumor versus Stroma). Keiner der weiteren klinischen Parameter (Grading, Gesamtüberlebenszeit, pT, Tumorstaging, cT und Geschlecht) wies allerdings ein Unsupervised Clustering hinsichtlich der Expressionsmuster in den beiden Kollektiven auf. Somit war keine Korrelation zwischen dem Expressionsmuster auf Protein- oder RNA-Ebene und den klinischen Parametern im Unsupervised Clustering nachweisbar. Exemplarisch dargestellt ist

das Ergebnis dieser Analyse für unvorbehandelte Proben auf Protein-Ebene (Abbildung 14).



Abbildung 14: Cluster Heatmap der differentiellen Protein-Expressionen.

Auf der Ordinate lassen sich in den ersten sieben Zeilen die klinischen Parameter finden: Grading, Gesamtüberlebenszeit, pT, Tumorstaging, cT, Geschlecht und ROI-Typ. Diese klinischen Parameter wurden jeweils in zwei Gruppen unterteilt und farblich voneinander abgesetzt. In einer Legende rechts neben der Heatmap werden die Farben der einzelnen klinischen Gruppen in ihre Untergruppen aufgeschlüsselt.

Unterhalb der klinischen Parameter sind die Expressionen auf Protein-Ebene zu erkennen. Auf der Abszissenachse sind die untersuchten Proben eingetragen.

Jeder Wert im Unsupervised Clustering wurde farblich markiert. Eine rote Färbung bedeutet, dass eine hohe Expression vorliegt, eine blaue Färbung stellt eine verminderte Expression dar.
## 4 Diskussion

Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, in der die DSP-Methode verwendet wurde, um die onkologischen und immunologischen Marker auf Proteinund RNA-Ebene im Tumor- und Stromagewebe des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs zu analysieren.

4.1 Vergleichbarkeit der generellen Expressionsprofile der untersuchten Marker auf Protein- und RNA-Ebene

Die PCA-Analyse ermöglicht die Beurteilung der generellen Expressionsprofile. Es wurden dafür PCA-Plots auf Protein- und RNA-Ebene angefertigt.

Im Tumorgewebe konnte auf Protein- und RNA-Ebene aufgezeigt werden, dass die Proben nah beieinander clustern. Auf RNA-Ebene ist dies etwas schwächer ausgeprägt. Im Stromagewebe zeigt das Expressionsmuster auf Protein- und RNA-Ebene ein etwas weniger deutliches Clustering. Insbesondere auf Protein-Ebene liegt eine stärkere Streuung vor. Ein Grund für das grundsätzlich schwächere Clustering und die daraus resultierende breite Streuung der Expressionsmuster im Stromagewebe könnte die sehr heterogene Population von Zellen sein, welche im Gegensatz zum Tumorgewebe vorhanden sind. (189,190)

Zusammenfassend zeigt die vorliegende PCA-Analyse auf Protein- und RNA-Ebene aber, dass anhand des generellen Expressionsmusters eine Unterscheidung der beiden Gewebetypen (Tumor und Stroma) möglich erscheint und dass die Expression der untersuchten Marker in den jeweiligen Geweben relativ gut clustern. (103,189,191–193)

Beim Duktalen Pankreaskarzinom konnten die beiden Studien von Grünwald et al. und Maurer et al. mittels der explorativen PCA-Analyse ebenfalls eine Differenzierung in das Tumor- und Stromagewebe ermitteln. (194–196) Weitere Untersuchungen beim Mammakarzinom und kolorektalen Karzinom konnten ebenfalls nachweisen, dass eine Differenzierung in Tumor- und Stromagewebe möglich ist. (197,198) 4.2 Untersuchung der Expressionsprofile der immuno-onkologischen Marker auf Protein- und RNA-Ebene bei Patienten ohne neoadjuvante Vorbehandlung

Hanahan und Weinberg publizierten 2011 den Artikel "The Hallmarks of cancer: The next Generation" (199). Sie fassten dabei die komplexen Prozesse der Tumorentstehung in zehn Prinzipien zusammen. In einem dieser Prinzipien wurde der Fokus vermehrt auf das Tumorstroma gelegt. So wird der Tumor nicht mehr auf seine Tumorzellen begrenzt, sondern als ein komplexes Organ angesehen, das aus einem Tumorzell- und Stromagewebekompartiment besteht. (199–203) Zwischen den beiden Kompartimenten herrscht eine komplexe wechselseitige Interaktion vor, deren Ausmaß größtenteils noch ungewiss ist (204,205).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte die Tumorarchitektur mit Hilfe unterschiedlich exprimierter immuno-onkologischer Marker zwischen Tumor- und Stromagewebe differenziert dargestellt werden (205-207). So ergaben die Ergebnisse der Volcano-Plots, dass signifikante Expressionsunterschiede zwischen dem Tumor- und Stromagewebe vorliegen, die eine Differenzierung zwischen Tumor und Stroma möglich machen (89,205,206,208). Im Tumorgewebe liegen im Gegensatz zum Stromagewebe signifikant exprimierte Marker vor, die pro-tumoral wirken. Im Stromagewebe haben die am stärksten exprimierten Marker wiederum eine anti-tumorale Wirkung (206,209,210). Die am stärksten exprimierten Marker im Stromagewebe auf Protein- und RNA-Ebene können den funktionellen Gruppen der Antigenpräsentation, der B-Zell-vermittelten Immunantwort, der Immun-Checkpoints, der Makrophagen, der pro-tumoral vermittelten Effektoren, der T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort, der immunsuppressiven Wirkung, der anti-tumoral vermittelten Effektoren, der T-Zell-Aktivierung, der Beteiligung an der Apoptose, der Zytokine und der Zelladhäsion zugeordnet werden.

Die zehn stärksten hochregulierten Expressionen im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe wurden auf Protein-Ebene (Abbildung 15a und b) und auf RNA-Ebene (Abbildung 16) in einem Schaubild veranschaulicht.



Abbildung 15a und b: Darstellung der zehn stärksten überexprimierten Expressionen im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe auf Protein-Ebene. Die stärksten exprimierten Expressionen wurden fett gekennzeichnet.

15a) Zu den stärksten Expressionen gehört das Oberflächenprotein **CD4**, das im Schaubild mittig dargestellt wird. Es wird auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Bei der Präsentation eines Antigens über ein MHC-Klasse-II-Komplex erfolgt die Bindung am T-Zell-Rezeptor und am **CD3**-Molekül. Das Antigen wird über eine antigenpräsentierende Zelle präsentiert. Nach erfolgter Bindung kommt es zur T-Zell-Aktivierung. Ein Teil der T-Zellen differenziert zu T-Gedächtniszellen (**CD45RO**). Die T-Zell-Aktivierung braucht unter anderem

kostimulatorische Signale, um eine effektive Immunantwort auszulösen. Zu den Kostimulatoren gehören **ICOS**, sein Ligand ICOSL und die Protein-Tyrosinphosphatase **CD45**. Neben diesen kostimulatorischen Signalen gibt es auch koinhibitorische Signale, die die T-Zell-Aktivierung supprimieren. (1,69,115,118)

Der Immun-Checkpoint-Rezeptor **CTLA-4** hat seinen Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen und auf Tumorzellen vorliegen. Ein weiterer Immun-Checkpoint ist **VISTA**, der ebenfalls die T-Zell-Aktivierung hemmt. (48,107)

Mittig oben im Schaubild ist die antigenpräsentierende Zelle dargestellt, auf der das Integrin **CD11c** vorliegt, das unter anderem ICAM1-4, iC3b und VCAM-1 bindet. (122)

Auf der rechten Seite des Schaubildes stimulieren Tumorzellen durch Freisetzung von IL-4, IL-6, IL-10 und TGF- $\beta$  M1-Makrophagen in M2-Makrophagen (**CD163**). Diese sind dann in der Lage, die Immunantwort durch Ausschüttung von VEGF-A, IL-10, TNF $\alpha$  und MMPs zu supprimieren. (110,111,211,212)

b) Im zweiten Schaubild ist das transmembrane Protein **STING.TMEM173** zu erkennen, das auf dem Endoplasmatischen Retikulum vorhanden ist. Es stimuliert die IFN-Produktion. Des Weiteren liegt erhöht exprimiert der Rezeptor **CD44** vor, der das metastasierende Potenzial der Tumorzellen aktiviert. (113,213) Quelle: Eigene Darstellung.



Abbildung 16: Darstellung der zehn stärksten überexprimierten Expressionen im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe auf RNA-Ebene. Die stärksten überexprimierten Expressionen wurden fett gekennzeichnet.

In der Abbildung 16 ist zunächst die CD4+-T-Zelle dargestellt, die mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle Antigene erkennt. Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden auch als HLA-Klasse-II-Moleküle bezeichnet. CD45 hat eine unterstützende Funktion bei der T-Zell-Aktivierung und findet sich auf der CD4<sup>+</sup>-T-Zelle. Die Gruppe der β2-Integrine werden unten rechts gezeigt und tragen unter anderem zur Formung der Immunologischen Synapse bei. (214,215) Die antigenpräsentierende Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche die Integrine CD11c und CSF1R. Der Rezeptor CSF1R bindet an seinen Liganden CSF1, wodurch er zur Entstehung des zweiten Makrophagen-Phänotyps beiträgt, der eine immunsuppressive Umgebung fördert. Weitere immunsuppressive Eigenschaften besitzt PECAM-1, das im Schaubbild mittig abgebildet ist. Es wird auf T-Zellen exprimiert und führt zu einer TGF-β-vermittelten Suppression der T-Zell-Aktivität. Die Immun-Checkpoints TIGIT und Tim-3 werden auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert. Die Bindung an ihren Liganden führt zur Inhibition der T-Zell-Aktivität. (122,138,139,158)

Die Ausschüttung von TGF- $\beta$  und IL-10 von regulatorischen Zellen (**FoxP3**) übt ebenfalls eine immunsuppressive und pro-tumorale Wirkung aus. (109,216) Quelle: Eigene Darstellung.

Zu den am signifikantesten überexprimierten Markern im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe auf Protein- und RNA-Ebene gehört CD4 (Abbildung 15a,16). Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen werden zur funktionellen Gruppe der T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort gezählt. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der adaptiven Immunantwort. Ihre anti-tumorale Wirkung besteht aus der Sekretion von IL-2, das CD8<sup>+</sup>-zytotoxische-T-Zellen aktiviert. Des Weiteren aktiviert die CD4<sup>+-</sup>-T-Zelle dendritische Zellen, die anschließend CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen-T-Zellen stimulieren. (69) Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen schütten zudem Zytokine wie IFN-γ und TNFα aus, die einen direkten zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen haben. (68,69,217) Antigene werden mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle an ihrem T-Zell-Rezeptor erkannt, der mit dem ebenfalls im Stroma gegenüber dem Tumor überexprimierten CD3-Molekül einen antigenbindenden Komplex bildet (Abbildung 15a, 16). (218)

Auf Protein-Ebene liegt ein weiterer T-Lymphozyten-vermittelter signifikanter überexprimierter Marker vor: CD45RO (Abbildung 15a). Nach Kontakt mit einem Antigen differenziert sich ein Teil der T-Zellen zu langlebigen T-Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere Immunantwort auslösen können. (219,220)

Eine hohe Konzentration von CD4, CD3, CD8 oder CD45RO korreliert im Magenkarzinom mit einer geringeren Metastasierungs- und Rezidivrate. Des Weiteren ist die Gesamtüberlebenszeit erhöht. Es ist daher möglich, dass eine Überexpression dieser Marker im Stromagewebe auch bei AEG Tumoren mit einer guten Prognose zu assoziieren ist. (221,222)

Zu den signifikant überexprimierten Biomarkern im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe gehört auch ICOS (Abbildung 15a). ICOS (Inducible T cell costimulator, CD278) ist ein Rezeptor, der auf der Oberfläche von T-Zellen vorliegt. Er kann funktionell der Gruppe der T-Zell-Aktivierung zugeordnet werden. Sein Ligand ICOS-L liegt auf antigenpräsentierenden Zellen vor. (118) Die anschließende Bindung am Liganden führt zur Proliferation und Aktivierung der T-Zelle (223,224). In Bezug auf ein Kolonkarzinom wurde eine erhöhte Expression von ICOS mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht (225,226).

Ein weiterer überexprimierter Marker auf Protein- und RNA-Ebene im Stroma gegenüber dem Tumor ist das Integrin CD11c (Abbildung 15a, 16). Es stellt den Marker für dendritische Zellen dar und liegt auch auf der Oberfläche von Monozyten, Granulozyten und Makrophagen vor. (227,228) Wang et al. verbanden eine hohe Expression von CD11c mit einer guten Prognose beim Magentumor. Es reduziert das Rezidivrisiko und wird mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert (229). CD44 (Abbildung 15b) ist ein Rezeptor für die Hyaluronsäure. Seine Funktion auf Tumorzellen führt dazu, dass das metastasierende Potenzial aktiviert wird. Zugleich nimmt CD44 Einfluss auf die Migration und Proliferation ein. (113,213)

Auf RNA-Ebene lassen sich im Stroma gegenüber dem Tumor die überexprimierten Zelladhäsionsmoleküle ITGB2 und PECAM-1 vorfinden.

Das β2-Integrin (ITGB2) und PECAM-1 sind Zelladhäsionsmoleküle, die in Interaktion mit der extrazellulären Matrix stehen. ITGB2 (Abbildung 16) ist an der T-Zell-Aktivierung beteiligt. Ein Defizit führt zu einer immunsuppressiven Umgebung. (157) Die Gruppe der  $\beta$ 2-Integrine besteht jeweils aus einer variablen  $\alpha$ -Einheit (CD11a, CD11b, CD11c und CD11d) und einer festen  $\beta$ -Einheit (CD18). CD11a/CD18 wird auf allen Leukozyten exprimiert. Es hat folgende Liganden: ICAM 1-5, ESM-1 und JAM1. Ebenfalls wird CD11b/CD18 (MAC-1) auf myeloischen Zellen, T-, B- und NK-Zellen exprimiert und bindet an viele unterschiedliche Liganden, unter anderem ICAM1-4, iC3b, JAM2, RAGE, Kollagen und VCAM-1. MAC-1 trägt zur Formung der Immunologischen Synapse zwischen der T-Zelle und der antigenpräsentierenden Zelle bei. (157,230) Es reguliert somit die Aktivierung der T-Zelle, indem es an das ICAM1 auf der antigenpräsentierenden Zelle bindet und zur Aktivierung der T-Zelle führt. CD11c/CD18 kommt auf dendritischen Zellen und Makrophagen vor. Es bindet an ICAM1-4, iC3b und VCAM-1. Zu den weiteren Funktionen der β2-Integrine gehört unter anderem die Bindung zwischen der zytotoxischen-T-Zelle und der Zielzelle. Außerdem nehmen sie Einfluss auf die Phagozytose und auf die Rekrutierung von Leukozyten. (122)

Das auf RNA-Ebene im Stroma überexprimierte PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 oder CD31) hat eine pro-tumorale Wirkung (Abbildung 16). Es ist ein Oberflächenmolekül, das auf den meisten neutrophilen Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Es ist an der Angiogenese, Apoptose und Thrombozytenaggregation beteiligt. Zudem nimmt es Einfluss auf die Antigenpräsentation zwischen der dendritischen Zelle und der naiven T-Zelle. Eine Hemmung von PECAM-1 führt zu einer TGFβ-vermittelten Suppression der T-Zellaktivität. (231,232) Gleichzeitig wird ein proliferativer Effekt auf Tumorzellen beschrieben. (158) Qingfang et al. konnten herausstellen, dass beim Mammakarzinom die Überexpression von PECAM-1 mit

einer schlechten Gesamtüberlebensrate assoziiert ist. Zugleich korreliert PECAM-1 positiv mit CD4<sup>+</sup>-und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen. (233)

Auf RNA-Ebene wird ebenfalls CD45 (Abbildung 16) im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe überexprimiert. Das der funktionalen Gruppe der T-Zell-Aktivierung zugehörige CD45 kontrolliert die src-Kinase, die einen regulierenden Einfluss auf den T-Zell-Rezeptor hat. (119)

Die HLA-Proteine (Abbildung 15a,16), auch MHC-Proteine genannt, dienen der Präsentation der Peptidfragmente. Auch sie wurden im Stroma gegenüber dem Tumor auf RNA-Ebene überexprimiert. Es werden zwei Gruppen unterschieden: zum einen die HLA-Klasse-I-Moleküle, die von fast allen Zellen gebildet werden, und zum anderen die HLA-Klasse-II-Moleküle, die auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert werden. (126) Die HLA-Klasse-I-Moleküle enthalten die HLA-Merkmale A, B und C. Die HLA-Klasse-II-Moleküle werden durch die Merkmale für DR, DQ und DP repräsentiert. Sie bestehen aus einer  $\alpha$  - und einer  $\beta$ -Kette, die bei HLA-DQ als DQA1 und DQB2 bezeichnet werden. (125)

Makrophagen können in einen pro-inflammatorischen (M1) oder antiinflammatorischen (tumor-unterstützenden, M2) Typ unterschieden werden (Abbildung 15a,16). In der Nähe des Tumors lassen sich hauptsächlich tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) vorfinden. Sie gelten als prognostisch ungünstig und werden dem zweiten Typ zugeordnet. (162,234) Der zweite Phänotyp entsteht hauptsächlich durch die Präsenz von CSF1 und seinem Rezeptor CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor) (235).

Der CSF1-Rezeptor (Abbildung 16) wird unter anderem auf Monozyten, dendritischen Zellen und Makropagen exprimiert (234,236,237). Mit der Bindung an seinem Liganden erfolgen die Proliferation und Differenzierung von Monozyten und Makrophagen. Die Makrophagen, die in der Tumorumgebung CSF1R exprimieren, unterstützen somit das Überleben der Tumorzelle, indem sie eine immunsuppressive und tumorfördernde Umgebung schaffen. (238,239) CSF1 und CSF1R regulieren zudem die zellulären Eigenschaften wie Migration und Proliferation. Aufgrund der starken Mitwirkung des CSF1R/CSF1-Signalweges bei der Polarisierung von TAMs konnte in Bezug auf das Magenkarzinom festgestellt werden, dass eine Überexpression von CSF1 mit einer schlechten Prognose einhergeht. (240)

Bei dem Molekül TIGIT (Abbildung 16) handelt es sich um einen Immun-Checkpoint-Rezeptor (138). Dieser Rezeptor bindet mit der höchsten Affinität an CD155 (241). Die Liganden werden auf antigenpräsentierenden Zellen und Tumorzellen exprimiert. Eine hohe TIGIT-Expression wird mit einer T-Zell-Anergie assoziiert. (138,241) Xu et al. stellten heraus, dass eine hohe TIGIT- und PD-1-Expression bei einem Magenkarzinom mit einer schlechten Prognose einhergehen (242,243).

Ein weiterer Vertreter der Immun-Checkpoint-Rezeptoren ist das Protein Tim-3 (T-Zell-Immunglobulin-Muzin-3), das u. a. an Galectin-9 und CEACAM-1 bindet (Abbildung 16). Die Liganden lassen sich auf der Oberfläche von Tumorzellen finden (244). Die Bindung zwischen Tim-3 und Galectin-9 führt zur Inhibition der T-Zell-Aktivität und somit zu einer immunsuppressiven Umgebung (244). Eine hohe Tim-3-Expression korreliert daher mit der Suppression der T-Zell-Aktivität und lässt auf anerge T-Zellen schließen (139). Demnach weist eine erhöhte Expression von Tim-3 im Magenkarzinom auf ein erhöhtes Tumorwachstum hin (245).

Ebenfalls wurden Treg-Zellen im Volcano-Plot exprimiert. Treg-Zellen (Abbildung 16) gehören zur Gruppe der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Sie unterdrücken die Aktivität von Immunzellen, indem sie Zytokine, wie IL-10, IL-35 und TGF-β, sezernieren. Treg-Zellen zerstören dendritische Zellen und Effektor-T-Zellen mittels Perforin und des Granenzyms B. (70)

Durch die Differenzierung in Tumor- und Stromagewebe mit Hilfe der DSP-Methode war zum ersten Mal die Trennung der beiden Kompartimente (Tumor- und Stromagewebe) anhand unterschiedlich stark überexprimierter Biomarker möglich. Es konnten somit Grundlagen für die Charakterisierung der einzelnen Kompartimente geschaffen werden. So wurden überexprimierte Marker im Gewebe definiert, die erst durch die Differenzierung erkennbar wurden. (205) Zugleich konnte deutlich gemacht werden, dass die signifikantesten überexprimierten Marker auf der Protein- und RNA-Ebene zum größten Teil eine anti-tumorale Antwort im Stromagewebe induzieren und eine pro-tumorale Antwort im Tumorgewebe vermitteln.

In weiteren Untersuchungen könnte die Analyse auf AEG-Typ-I- und AEG-Typ- III-Tumore ausgeweitet werden, um zu ermitteln, ob Unterschiede in der Überexpression bestehen und ob die Verteilung der Biomarker verändert ist.

4.3 Untersuchung der Expressionsprofile der immuno-onkologischen Marker auf Protein- und RNA-Ebene bei Patienten mit neoadjuvanter Vorbehandlung

In einer weiteren Analyse fand die quantitative Messung der immuno-onkologischen Marker auf Protein- und RNA-Ebene im Tumor- und Stromagewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung statt. Wie bei der Untersuchung des Tumor- und Stromagewebes ohne neoadjuvante Vorbehandlung konnten hier signifikante Expressionsunterschiede von Biomarkern zwischen Tumor- und Stromagewebe auf Protein- und RNA-Ebene festgestellt werden.

Im Stromagewebe sind auf Protein-Ebene zwölf weitere Expressionen gegenüber dem Tumorgewebe hinzugekommen. Zu diesen Biomarkern gehören: GZMB, pS6, Histone.H3, BCL2, AKT, P.AKT, IDO1, Rabbit. IgG, PD-1, CD66B, STAT3 und β<sub>2</sub>-Mikroglobulin. Diese neu hinzugekommenen Biomarker können folgenden funktionellen werden: GZMB Gruppen zugeordnet wird zur T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort gezählt; pS6, Histone.H3, AKT, P.AKT, IDO.1, CD66B und STA3 gehören wiederum zu den pro-tumoral vermittelten Effektoren. BCL2 ist an der Apoptose beteiligt, β<sub>2</sub>-Mikroglobulin kann der Antigenpräsentation und PD-1 den Immun-Checkpoints zugeordnet werden. Für die Negativkontrolle wurde Rabbit.lgG verwendet. Die meisten neu auftretenden Biomarker haben eine pro-tumorale Wirkung.

Die zehn stärksten hochregulierten Expressionen im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung wurden auf Protein-Ebene (Abbildungen 17a und b) und auf RNA-Ebene (Abbildung 18) in einem Schaubild veranschaulicht.



Abbildung 17a und b: Darstellung der zehn stärksten überexprimierten Expressionen im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe auf Protein-Ebene nach neoadjuvanter Vorbehandlung. Die stärksten überexprimierten Expressionen wurden fett gekennzeichnet.

17a) Ähnlich zur Protein-Expression ohne neoadjuvante Vorbehandlung bestehen die stärksten Protein-Expressionen im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe nach neoadjuvanter Vorbehandlung unter anderem aus CD4, gefolgt vom Glykoprotein CD8A, das auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird. Die CD8+-zytotoxischen-T-Zelle wird im Schaubild oben links gezeigt. An den CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen-T-Zellen bindet ein Antigen am T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex, das über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert wird. Nach der Aktivierung zerstören CD8+-zytotoxische-T-Zellen maligne Zellen. Das immunologische Gedächtnis wird von der T-Gedächtniszelle gebildet **(CD45RO)**, die sich links unten in der Abbildung findet. (69,115,116)

Auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen liegt der Rezeptor CD45 vor, der einen regulierenden Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung hat. Auf der antigenpräsentierenden Zelle bindet das Integrin **CD11c**, an ICAM1-4, iC3b und VCAM-1. (119,122,246)

Nach der neoadjuvanten Vorbehandlung wird **CD68** überexprimiert im Stroma gegenüber dem Tumor gefunden. Es ist ein Oberflächenmarker für M1- und M2-Makrophagen sowie für Monozyten. (247,248) M2-Makrophagen **(CD163)** werden durch Freisetzung von IL-4, IL-6, IL-10 und TGF-β stimuliert (111).

 b) Ähnlich zu den Proben ohne neoadjuvante Vorbehandlung werden die Biomarker
 STING.TMEM173 und CD44 im Stroma signifikant überexprimiert. STING.TMEM173 stimuliert die IFN-Produktion und der Rezeptor CD44 aktiviert das metastasierende Potenzial. (113,213)
 Quelle: Eigene Darstellung.



Abbildung 18: Darstellung der zehn stärksten überexprimierten Expressionen im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe auf RNA-Ebene nach neoadjuvanter Vorbehandlung. Die stärksten überexprimierten Expressionen wurden fett gekennzeichnet.

Die am stärksten überexprimierten RNA-Expressionen mit neoadjuvanter Vorbehandlung im Stroma gegenüber dem Tumor sind fast die gleichen wie bei den RNA-Expressionen ohne neoadjuvante Vorbehandlung. Auch hier sind **CSF1R**, **CD11c**, **ITGB2**, **CD45**, **PECAM-1**, **TIGIT** am stärksten überexprimiert. Neu hinzugekommen sind **CD3E**, **CCL5** und **BCL-2**. CD3E (CD3ɛ) ist ein Bestandteil des CD3-Rezeptors, der einen Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor bildet. (114)

Oben rechts im Schaubbild ist das Chemokin CCL5 dargestellt. Es bindet an die Rezeptoren CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CD44 und GPR75. Die Bindung von CCL5 an CCR5 führt zur Tumorprogression und -migration. Zudem wird dadurch die Polarisierung von Makrophagen sowie Fibroblasten in immunsuppressive TAMs und CAFs gefördert, die dann Tregs begünstigen. Das Protein Bcl-2 leitet die Apoptose mit Hilfe des intrinsischen Signalweges ein. (249) Quelle: Eigene Darstellung.

Das überexprimierte Granzym B (GZMB) und die Bcl-2-Proteine (Abbildung 18) haben Anteil an der Apoptose, die über drei Wege ausgelöst wird: den extrinsischen intrinsischen Weg oder den Weg, den Granzym-Signalweg. (153, 250)CD8<sup>+</sup>-zytoxische-T-Zellen und natürliche Killerzellen können durch Ausschüttung von Granzym B die Apoptose auslösen. Das Granzym B gelangt als erstes über Perforin in das Zytoplasma. Es gibt zwei Mechanismen, die daraufhin die Apoptose einleiten. Zum einen geschieht dies über die Caspase 3, zum anderen ist es über das pro-apoptische Bcl-2-Protein Bid, das den intrinsischen Signalweg auslöst, möglich. Beim intrinsischen Signalweg verhindert das anti-apoptische Protein Bcl-2 die Bindung zwischen Bax und Bak. Das Granzym B führt zur Aktivierung von Bid. Bcl-2 ist daher nicht mehr in der Lage, die Oligomerisierung der Bcl-2-Proteine Bax und Bak zu verhindern. (250–252) Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C, das mit Apaf-1 das Apotosom herstellt und zur Bildung der Caspase-9 führt. Die Caspasen 3, 6 und 7 werden dann durch die Caspase 9 aktiviert und führen zur Zerstörung der Zelle. (126) Das Granzym B ist zudem imstande, die Caspase 3 über die direkte Caspasenaktivierung zu spalten und somit die Apoptose einzuleiten. (126,253) Die dazugekommene Überexpression von GZMB wird beim Mammakarzinom nach neoadjuvanter Vorbehandlung mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit assoziiert, fünf Jahre nach Therapieende kein Rezidiv zu entwickeln (254).

Auch die Überexpression von BCL2 nach neoadjuvanter Vorbehandlung wurde bei Patienten mit Mammakarzinom festgestellt und mit einer besseren Gesamtprognose in Verbindung gebracht (255).

Eine weiterer Biomarker, der auf Protein-Ebene überexprimiert hinzugekommen ist, ist die Expression des ribosomalen S6-Proteins . Es hat im phosphorylierten Status einen fördernden Einfluss auf die Zellproliferation und auf die Glukosehomöostase. Dieser Zustand wird mit Hilfe von Wachstumsfaktoren oder durch tumorale Einflüsse herbeigeführt. (256,257) Gleichzeitig wird S6 für die Expression von Akt gebraucht (258).

Akt, ein Onkogen, ist gleichbedeutend mit der Proteinkinase B (259,259). Es agiert mit PIP3 und wird damit an die Plasmamembran gebracht. Anschließend phosphoryliert PDK-1 die Phosphorylierungsstelle T308 und aktiviert so Akt. Die vollständige Aktivierung wird erreicht, wenn die Phosphorylierungsstelle S473 ebenfalls phosphoryliert wird. Dieser Aktivierungsprozess wird als

PI3K/Akt-Signalweg bezeichnet und führt zur Proliferation der Zelle und zur Hemmung der Apoptose. Das AKT-Molekül wird erforscht, da seine Aktivierung zur Entstehung von Tumoren führt. AKT-Inhibitoren stehen daher beim Magenkarzinom in der Entwicklung. (147,260–262)

IDO1 bezeichnet die Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, ein Enzym, das Tryptophan in das immunsuppressive Kynurenin umwandelt. Es wird von Tumorzellen, Immunzellen und Fibroblasten exprimiert. Zudem wird die Aktivität von IDO1 durch STAT3, TNF und IL-1 induziert. (144,263,264) IDO1 führt zur Suppression der T-Zell-Aktivierung, hemmt NK-Zellen und induziert Tregs (144,265). Neben diesen immunsuppressiven Mechanismen verstärkt es das Metastasierungspotenzial, die Vaskularisierung und das Tumorwachstum (266). Ruidi Jiao et al. belegten in einer Analyse, dass bei einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ebenfalls nach neoadjuvanter Vorbehandlung Expressionsunterschiede von IDO1 vorlagen. Diese korrelierten mit einer schlechteren Prognose (267).

Ein weiteres Protein, das nun signifikant überexprimiert wird, ist STAT3. STAT3 bindet an DNA-Sequenzen und aktiviert die Transkription von Genen, wodurch es die Progression, Metastasierung und Apoptose von Tumorzellen beeinflusst. (264,268–270) Des Weiteren beeinflusst das Protein die Aktivierung von NK-Zellen, Effektor-T-Zellen und dendritischen Zellen, weshalb es eine immunsuppressive Wirkung hat. (270) STAT3 hemmt zugleich die STAT1 induzierte Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen. Es führt zur Hemmung der CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zell-Aktivität. Zugleich stimuliert es den Übergang von M1- zu M2-Makrophagen. (264) In einer Phase-I-Studie, in der ein STAT3-Inhibitor verwendet wurde, konnte bei Patienten mit malignen Lymphomen und Lungenkarzinom die Proliferation von Tumorzellen gehemmt werden. (271)

Auf RNA-Ebene führte die neoadjuvante Vorbehandlung zu einer Reduktion der Anzahl der Biomarker. Zu den Markern, die nach der neoadjuvanten Vorbehandlung nicht mehr im Stromagewebe überexprimiert wurden, gehören: OAZ1, B7.H3, POLR2A, CD20, IDO1, ITGAV, STAT1, B2M, IFNG, HLA.E, IFNGR1, AKT1, STAT3, CD44, KI67, RAB7A, CCND1 und CD47.

OAZ1, IDO1, STAT1, AKT1, STAT3, CD44, KI67, RAB7A und CCND1 können der funktionellen Gruppe der anti-tumoral vermittelten Effektoren zugeordnet werden. B7.H3 kann mit den Immun-Checkpoints, CD20 mit der B-Zell vermittelten Immunantwort, ITGAV mit der Zelladhäsion, B2M mit der Antigenpräsentation, IFNG und IFNGR1 mit den Zytokinen und CD47 wiederum mit der Zelladhäsion in Verbindung gebracht werden. Bei POLR2A handelt es sich um eine Untereinheit des RNA-Polymerase-II-Komplexes.

Ein Großteil der durch die neoadjuvante Vorbehandlung nicht mehr überexprimierten Expressionen sind Biomarker, die einen pro-tumoralen Effekt ausgeübt haben. Gegenüber dem Stromagewebe ist als einziges der Marker Pan-Zytokeratin auf Protein-Ebene im Tumorgewebe überexprimiert. Auf RNA-Ebene wurde im Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe nur noch Multi.KRT überexprimiert.

In mehreren Studien konnte bezüglich des Mammakarzinoms belegt werden, dass die neoadjuvante Therapie die Expressionen von Biomarkern verändert (272). In der Analyse, die dieser Arbeit zugrunde liegt, sank die Expressionsstärke und die Signifikanz gegenüber den Proben ohne neoadjuvante Vorbehandlung.

Interessanterweise zeigte sich auf Protein-Ebene ein anderes Bild als auf RNA-Ebene. Es wurden zwölf weitere Proteine im Vergleich zu den unbehandelten Proben überexprimiert. Die meisten hinzugekommenen Biomarker haben eine pro-tumorale Wirkung. Zugleich veränderte sich das Verhältnis zwischen pro- und anti-tumoral wirkenden Biomarker. In den vorbehandelten Proben lagen auf RNA-Ebene mehr anti-tumorale Biomarker und auf Protein-Ebene mehr Marker mit pro-tumoraler Wirkung vor. Bei den nicht vorbehandelten Proben konnten dagegen auf Protein-Ebene mehr anti-tumorale Biomarker und auf RNA-Ebene mehr mehr anti-tumorale Biomarker und auf Protein-Ebene mehr mehr pro-tumorale Biomarker gefunden werden.

Es ist unklar, weshalb die Biomarker auf Protein- und RNA-Ebene so unterschiedlich auf die neoadjuvante Behandlung reagiert haben. Weitere Untersuchungen sind daher erforderlich, um den Einfluss und die Wirkung der neoadjuvanten Therapie auf Protein- und RNA-Ebene zu verstehen.

Eine weitere Beobachtung konnte bezüglich der Exprimierung einzelner Biomarker gemacht werden: B7.H3 wird nach der neoadjuvanten Vorbehandlung nicht mehr auf RNA-Ebene im Stromagewebe überexprimiert. Auf Protein-Ebene liegt es jedoch bei neoadjuvanter Vorbehandlung immer noch überexprimiert vor. Die gleiche Feststellung konnte hinsichtlich der Marker CD20, IDO1 und STAT3 getroffen werden. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede könnten epigenetische Effekte sein, die die Genaktivität und das Expressionsverhalten

regulieren. Die epigenetischen Mechanismen variieren zwischen den einzelnen Geweben und Zellen. So enthält jede Zelle dieselbe DNA-Sequenz, die allerdings durch epigenetische Mechanismen reguliert wird und wodurch die Zelldifferenzierung gesteuert wird. (273–275) Zu diesen Mechanismen gehören u. a. die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikation und die nichtkodierenden RNAs (276). Zudem konnte beobachtet werden, dass die epigenetischen Mechanismen in kanzerösen Geweben gestört sind und zu Veränderungen in der Proliferation und der Apoptose führen können (274). Es wird angenommen, dass die Korrelation zwischen der RNA- und Protein-Expression bei ca. 40 % liegt (277,278).

4.4 Intratumorale Vergleichbarkeit der Expressionsprofile auf Protein- und RNA-Ebene innerhalb eines Präparates im Tumor und Stroma

In einigen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass solide Tumore heterogen aufgebaut sind und regionale Unterschiede innerhalb eines Tumors vorliegen (279,280). Diese regionalen Unterschiede entstehen aufgrund zahlreicher Mutationen, die als ein Grund für Tumorprogression, Metastasierung und Immunevasion angesehen werden (282). Intratumorale Vielfalt führt dazu, dass Resistenzen auftreten und die Wirksamkeit von Chemotherapeutika, insbesondere bei Patienten mit Metastasen, geringer ist. Aufgrund dieser Beobachtung wird die intratumorale Heterogenität mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (281,283) In einer weiteren Untersuchung sollte ermittelt werden, ob innerhalb eines Präparates vergleichbare Expressionsprofile im Tumor- und Stromakompartiment vorliegen. Um die Vergleichbarkeit der Expressionsprofile zu evaluieren, wurden bei fünf unvorbehandelten Proben zwei ROIs ausgewählt und anschließend miteinander verglichen. Alle fünf Präparate wiesen einen hohen bis moderaten Korrelationskoeffizienten auf Protein- und RNA-Ebene auf, der auf Homogenität und eine intraindividuelle Reproduzierbarkeit im Tumor- und Stromakompartiment hinwies. (284)

Trotz identifizierter intratumoraler Heterogenität beim Adenokarzionom des gastroösophagealen Übergangs wurde in unserer Untersuchung eine Homogenität im Tumor- und Stromakompartiment beobachtet (280,285,286). Eine mögliche

Erklärung für die Beobachtung in unserer Studie könnte sein, dass in unserer Analyse das Gesamtgewebe in die zwei genannten Kompartimente (Tumor und Stroma) differenziert wurde, während bei Untersuchungen der intratumoralen Heterogenität die gesamte Tumormasse untersucht worden ist, die aus vermischten Tumor- und Stromagewebe besteht. (287–289) Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um diese Beobachtungen weiter zu verifizieren.

In einer vergleichenden Untersuchung zeigten Large et al. am duktalen Adenokarzinom des Pankreas auf, dass im Tumorkompartiment auf Protein-Ebene eine höhere Heterogenität vorliegt als im Stromakompartiment. Als ein denkbarer Grund wurde von den Autoren die möglicherweise genetische Instabilität der Tumorzellen diskutiert. (189) In Anbetracht der Ergebnisse sollten auch AEG-Typ-I- und AEG-Typ-III-Tumore bezüglich ihrer Homogenität im Tumor- und Stromakompartiment in weiteren Analysen untersucht werden.

#### 4.5 Korrelation der immuno-onkologischen Marker mit klinischen Daten

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine Unsupervised Clusteranalyse der unbehandelten Proben und der vorbehandelten Proben auf Protein- und RNA-Ebene mit klinischen Parametern durchgeführt. Mit Hilfe der Clusteranalyse sollte ermittelt werden, ob Korrelationen zwischen den klinischen Parametern und den Expressionsmustern vorhanden sind und ob gewisse Marker prognosebestimmend sind. Zur Visualisierung diente eine Heatmap. (290,291) Die Daten weisen darauf hin, dass ein deutliches Clustering bei der Differenzierung in die zwei Gewebetypen vorliegt. In Bezug auf die klinischen Parameter zeigte sich in unserer Analyse kein Clustering. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen den klinischen Parametern und den Expressionsmustern könnte die kleine Patientenanzahl sein. Aufgrund dessen sollten weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten durchgeführt werden, damit abschließend beurteilt werden kann, ob eine solche Korrelation vorhanden ist. (292) Zudem sollten Einzelanalysen zwischen den einzelnen klinischen Parametern und dem jeweiligen Expressionsmuster erfolgen, um mögliche Korrelationen nachzuweisen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt liegt kein relevanter klinischer Biomarker für die Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs vor (280,293). Die zehn stärksten Protein-Expressionen wurden in Kapitel 4.2 hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit diskutiert.

Guo et al. untersuchten in ihrer Studie klinischpathologische Parameter, um prognostische Faktoren zu ermitteln. Dabei stellten sie fest, dass ein hohes Alter über 70 Jahre, ein T3/T4-Stadium und das N3-Stadium mit einer schlechten Prognose und einer geringeren Gesamtüberlebenszeit einhergehen. (292)

### 4.6 Limitation der Arbeit

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Daten von 39 Patient/-in mit der Diagnose des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs Typ II über einen Zeitraum von 1993 bis 2014 ausgewertet. Die Ergebnisse sind mit Einschränkungen verbunden: Die 39 Patientendaten stellen eine relativ kleine Kohorte dar und nur eine Tumorentität (AEG-Typ II) wurde untersucht. Direkte Vergleiche der Ergebnisse aus unserer Studie zu anderen publizierten Ergebnisse waren zudem nicht möglich, da in den meisten Publikationen auf die gesamte Tumormasse Bezug genommen wird oder nicht zwischen den Tumoren des gastroösophagealen Übergangs, des Ösophagus und des Magens unterschieden Einschränkungen wird. Aufgrund dieser sollten die Analysen dieser Promotionsarbeit mit einer größeren Menge an Patient/-in, die AEG-Typ-I- und AEG-Typ-III-Tumore haben, wiederholt werden. Zudem sollten die Korrelationen zwischen klinischen Parametern und Expressionsmuster mit Einzelanalysen wiederholt untersucht werden.

#### 4.7 Zusammenfassung

**Einleitung:** Für die vorliegende Dissertation wurden Proben des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs Typ II quantitativ auf Protein- und RNA-Ebene untersucht. Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob eine

Differenzierung zwischen Tumor- und Stromagewebe aufgrund unterschiedlich exprimierter Biomarker auf Protein- und RNA-Ebene möglich ist. Es lagen Proben mit und ohne neoadjuvanter Vorbehandlung vor. Zudem wurde untersucht, ob eine Homogenität innerhalb eines Tumor- und Stromakompartiments vorhanden ist. Abschließend wurden klinische Daten mit differentiellen Expressionsanalysen korreliert.

**Methoden:** Die quantitative Messung von onkologischen und immunologischen Markern auf Protein- und RNA-Ebene erfolgte mit Hilfe der neuartigen DSP-Methode der Firma Nanostring. Hierbei wurde in jeder Probe eine ROI ausgewählt, die aus Tumor- und Stromagewebe bestand.

**Ergebnisse**: Bei der Beurteilung der generellen Expressionsprofile konnte festgestellt werden, dass eine Differenzierung der beiden Gewebetypen (Tumor/Stroma) möglich ist. In einer weiteren Analyse wurde deutlich, dass signifikante Unterschiede in der Expression auf Protein- und RNA-Ebene zwischen Tumor- und Stromagewebe vorliegen. Ähnlich Ergebnisse konnten auch bei neoadjuvant vorbehandelten Proben beobachtet werden. Zudem zeigten sich auf Protein- und RNA-Ebene vergleichbare intratumorale Expressionsprofile. Im Unsupervised Clustering konnte dagegen aufgezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen klinischen Parametern und den Expressionsmustern vorliegen.

Diskussion: Die Ergebnisse zeigen, dass eine Unterscheidung in Tumor- und Stromagewebe möglich ist. Die Charakterisierung der einzelnen Kompartimente veranschaulicht, dass die stärksten überexprimierten Marker auf Protein- und RNA-Ebene zum größten Teil eine anti-tumorale Antwort im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe induzieren und eine pro-tumorale Antwort im Tumorgewebe Stromagewebe vermitteln. Die moderaten gegenüber dem hohen bis Korrelationskoeffizienten auf Protein- und RNA-Ebene schließen auf eine Homogenität und intraindividuelle Reproduzierbarkeit im Tumorund Stromakompartiment hin. Die fehlende Korrelation zwischen klinischen Parametern differentiellen und Expressionsmustern kann keinen Marker als prognosebestimmend hervorheben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit erstmals an AEG II Tumoren verwandte Technik des Digital Spatial Profilings eine hervorragende Möglichkeit bietet, Gewebe aus Tumoren ohne physische Mikro-Dissektion in unterschiedlichen Kompartimenten der Proben auf Expressionen von Tumor-relevanten Genen zu untersuchen.

# Literaturverzeichnis

1. Aumüller, Gerhard, Aust, Gabriela, Engele, Jürgen. Duale Reihe. 3. Auflage.

2. Zilles K, Tillmann B. Anatomie. Springer-Verlag; 2011. 1025 S.

3. Cellini F, Morganti AG, Di Matteo FM, Mattiucci GC, Valentini V. Clinical management of gastroesophageal junction tumors: past and recent evidences for the role of radiotherapy in the multidisciplinary approach. Radiat Oncol Lond Engl. 5. Februar 2014;9:45.

4. Lin D, Khan U, Goetze TO, Reizine N, Goodman KA, Shah MA, u. a. Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma: Is There an Optimal Management? Am Soc Clin Oncol Educ Book. 1. Mai 2019;(39):e88–95.

Siewert JR, Schumpelick V, Rothmund M, Schumpelick V, Herausgeber.
 Praxis der Viszeralchirurgie: Gastroenterologische Chirurgie [Internet]. 3. Aufl.
 Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011 [zitiert 24. Oktober 2020]. (Praxis der Viszeralchirurgie).
 Verfügbar
 unter: https://www.springer.com/de/book/9783642142222

Epidemiologie bösartiger Tumoren der Speiseröhre in Deutschland unter Berücksichtigung der histologischen Typen [Internet]. springermedizin.de. [zitiert 24. Oktober 2020]. Verfügbar unter: https://www.springermedizin.de/oesophaguskarzinom/oesophaguskarzinom/epide miologie-boesartiger-tumoren-der-speiseroehre-in-

deutschlan/17738012?fulltextView=true

7. Buas MF, Vaughan TL. Epidemiology and risk factors for gastroesophageal junction tumors: understanding the rising incidence of this disease. Semin Radiat Oncol. Januar 2013;23(1):3–9.

8. Gokulan RC, Garcia-Buitrago MT, Zaika AI. From Genetics to Signaling Pathways: Molecular Pathogenesis of Esophageal Adenocarcinoma. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. August 2019;1872(1):37–48.

9. Bujanda DE, Hachem C. Barrett's Esophagus. Mo Med. 2018;115(3):211–3.

10. Kuipers EJ, Spaander MC. Natural History of Barrett's Esophagus. Dig Dis Sci. 2018;63(8):1997–2004.

11. Lekakos L, Karidis NP, Dimitroulis D, Tsigris C, Kouraklis G, Nikiteas N. Barrett's esophagus with high-grade dysplasia: Focus on current treatment options. World J Gastroenterol WJG. 7. Oktober 2011;17(37):4174–83.

12. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Epidemiologie, Diagnostik und Therapie des Barrett-Karzinoms [Internet]. Deutsches Ärzteblatt. 2015 [zitiert 24. Oktober 2020]. Verfügbar unter: https://www.aerzteblatt.de/archiv/168936/Epidemiologie-Diagnostik-und-Therapiedes-Barrett-Karzinoms

13. Koop H, Fuchs KH, Labenz J, Jansen PL, Messmann H, Miehlke S, u. a. Gastroösophageale Refluxkrankkheit unter Federführung Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). :113.

Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. World J Gastroenterol WJG.
 September 2013;19(34):5598–606.

15. Cook MB, Kamangar F, Whiteman DC, Freedman ND, Gammon MD, Bernstein L, u. a. Cigarette Smoking and Adenocarcinomas of the Esophagus and Esophagogastric Junction: A Pooled Analysis From the International BEACON Consortium. JNCI J Natl Cancer Inst. 8. September 2010;102(17):1344–53.

16. Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N, Smithers BM, Gotley DC, Bain CJ, u. a. Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. Gut. 1. Februar 2008;57(2):173–80.

17. Lerut T. Carcinoma of the esophagus and gastro-esophageal junction [Internet]. Surgical Treatment: Evidence-Based Problem-Oriented. and [zitiert 2021]. Zuckschwerdt; 2001 24. April Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6982/

18. Chevallay M, Bollschweiler E, Chandramohan SM, Schmidt T, Koch O, Demanzoni G, u. a. Cancer of the gastroesophageal junction: a diagnosis, classification, and management review. Ann N Y Acad Sci. 2018;1434(1):132–8.

19. S3-Leitlinie Ösophaguskarzinom. 2018;164.

20. MA J, SHEN H, KAPESA L, ZENG S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. Oncol Lett. Mai 2016;11(5):2959–64.

21. Petrelli F, Berenato R, Turati L, Mennitto A, Steccanella F, Caporale M, u. a. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. J Gastrointest Oncol. Februar 2017;8(1):148–63.

22. Ott K, Böttcher K, Werner M, Busch R, Roder JD. Erlaubt die neue UICC-Klassifikation eine bessere Prognoseabschätzung für das duktale Pankreascarcinom? Chir. 1. Februar 2000;71(2):189–95.

23. Kato S, Okamura R, Baumgartner JM, Patel H, Leichman L, Kelly K, u. a. Analysis of Circulating Tumor DNA and Clinical Correlates in Patients with Esophageal, Gastroesophageal Junction and Gastric Adenocarcinoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15. Dezember 2018;24(24):6248–56.

24. Kähler G, Götz M, Senninger N, Herausgeber. Therapeutische Endoskopie im Gastrointestinaltrakt [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2016 [zitiert
24. Oktober 2020]. Verfügbar unter: https://www.springer.com/de/book/9783662451939

25. Mönig S, Ott K, Gockel I, Lorenz D, Ludwig K, Messmann H, u. a. S3-Leitlinie Magenkarzinom – Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs: Version 2.0 – August 2019. AWMF-Registernummer: 032/009OL. Chir. Januar 2020;91(1):37–40.

26. Probst A, Pagitz M, Messmann H, Albert J. Endoskopische Resektionsverfahren EMR und ESD – Schritt für Schritt. Gastroenterol Up2date. Dezember 2018;14(04):309–19.

27. Wang W-P, Ni P-Z, Yang J-L, Wu J-C, Yang Y-S, Chen L-Q. Esophagectomy after endoscopic submucosal dissection for esophageal carcinoma. J Thorac Dis. Juni 2018;10(6):3253–61.

28. Gurusamy KS, Pallari E, Midya S, Mughal M. Laparoscopic versus open transhiatal oesophagectomy for oesophageal cancer. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 31. März 2016 [zitiert 26. Oktober 2020];2016(3). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7086382/

29. Hoeppner J, Plum PS, Buhr H, Gockel I, Lorenz D, Ghadimi M, u. a. Chirurgische Therapie des Ösophaguskarzinoms – Qualitätsindikatoren für Diagnostik und Therapie. Chir Z Alle Geb Oper Medizen. 2021;92(4):350–60.

30. Thuss-Patience P, Biebl M, Stromberger C. Multimodale Therapie des Ösophaguskarzinoms. Onkol. 1. September 2017;23(9):771–88.

31. Barbour AP, Jones M, Brown I, Gotley DC, Martin I, Thomas J, u. a. Risk Stratification for Early Esophageal Adenocarcinoma: Analysis of Lymphatic Spread and Prognostic Factors. Ann Surg Oncol. 1. September 2010;17(9):2494–502. 32. Cho JW, Choi SC, Jang JY, Shin SK, Choi KD, Lee JH, u. a. Lymph Node Metastases in Esophageal Carcinoma: An Endoscopist's View. Clin Endosc. November 2014;47(6):523–9.

33. Zheng Z, Yin J, Wu H-W, Li J, Cai J, Qin S-Q, u. a. Explored Risk Factors for Lymph Node Metastasis with Siewert II/III Adenocarcinoma of the Gastroesophageal Junction. Anticancer Res. 1. August 2017;37(8):4605–10.

34. Davidson M, Chau I. Multimodality treatment of operable gastric and oesophageal adenocarcinoma: evaluating neoadjuvant, adjuvant and perioperative approaches. Expert Rev Anticancer Ther. 12. Februar 2018;18:1–12.

35. Greally M, Agarwal R, Ilson DH. Optimal management of gastroesophageal junction cancer. Cancer. 2019;125(12):1990–2001.

36. Haag GM, Czink E, Ahadova A, Schmidt T, Sisic L, Blank S, u. a. Prognostic significance of microsatellite-instability in gastric and gastroesophageal junction cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Int J Cancer. 2019;144(7):1697–703.

37. Ashraf N, Hoffe S, Kim R. Locally Advanced Gastroesophageal Junction Tumor: A Treatment Dilemma. The Oncologist. Februar 2015;20(2):134–42.

38. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. Immunity. 25. Juli 2013;39(1):1–10.

39. Moehler M, Delic M, Goepfert K, Aust D, Grabsch HI, Halama N, u. a. Immunotherapy in gastrointestinal cancer: Recent results, current studies and future perspectives. Eur J Cancer. 1. Mai 2016;59:160–70.

40. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MWL. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. Nat Rev Clin Oncol. März 2016;13(3):143–58.

41. Zhao D, Klempner SJ, Chao J. Progress and challenges in HER2-positive gastroesophageal adenocarcinoma. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 17 2019;12(1):50.

42. Knief J, Reddemann K, Petrova E, Herhahn T, Wellner U, Thorns C. High Density of Tumor-infiltrating B-Lymphocytes and Plasma Cells Signifies Prolonged Overall Survival in Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. Anticancer Res. 10. Januar 2016;36(10):5339–45.

43. Smyth E, Thuss-Patience PC. Immune Checkpoint Inhibition in Gastro-Oesophageal Cancer. Oncol Res Treat. 2018;41(5):272–80. 44. Lin EM, Gong J, Klempner SJ, Chao J. Advances in immuno-oncology biomarkers for gastroesophageal cancer: Programmed death ligand 1, microsatellite instability, and beyond. World J Gastroenterol. 7. Juli 2018;24(25):2686–97.

45. Yuan J, Zhang J, Zhu Y, Li N, Tian T, Li Y, u. a. Programmed death-ligand-1 expression in advanced gastric cancer detected with RNA in situ hybridization and its clinical significance. Oncotarget. 15. Mai 2016;7(26):39671–9.

46. Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, u. a. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE [Internet]. 10. August 2017 [zitiert 24. Oktober 2020];12(8). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5552131/

47. Kelly RJ. Immunotherapy for Esophageal and Gastric Cancer. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 1. Mai 2017;(37):292–300.

48. Khailaie S, Rowshanravan B, Robert PA, Waters E, Halliday N, Badillo Herrera JD, u. a. Characterization of CTLA4 Trafficking and Implications for Its Function. Biophys J. Oktober 2018;115(7):1330–43.

49. Choi AH, Kim J, Chao J. Perioperative chemotherapy for resectable gastric cancer: MAGIC and beyond. World J Gastroenterol WJG. 28. Juni 2015;21(24):7343–8.

50. Cheng J, Liang M, Carvalho MF, Tigue N, Faggioni R, Roskos LK, u. a. Molecular Mechanism of HER2 Rapid Internalization and Redirected Trafficking Induced by Anti-HER2 Biparatopic Antibody. Antibodies [Internet]. 18. September 2020 [zitiert 25. Oktober 2020];9(3). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551206/

51. Davidson M, Starling N. Trastuzumab in the management of gastroesophageal cancer: patient selection and perspectives. OncoTargets Ther.
25. November 2016;9:7235–45.

52. Bruder DI, Damrau C, Dippmann DAK, Hengelbrock J, Lebeau DA. Qualitätsaspekte der HER2-Bestimmung. 2019;28.

53. Young K, Smyth E, Chau I. Ramucirumab for advanced gastric cancer or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma. Ther Adv Gastroenterol. November 2015;8(6):373–83.

54. Lote H, Valeri N, Chau I. HER2 inhibition in gastro-oesophageal cancer: A review drawing on lessons learned from breast cancer. World J Gastrointest Oncol.
15. Juli 2018;10(7):159–71.

55. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 (VEGFR2) AS A MARKER FOR MALIGNANT VASCULAR TUMORS AND MESOTHELIOMA – IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 262 VASCULAR ENDOTHELIAL AND 1640 NONVASCULAR TUMORS [Internet]. [zitiert 24. Oktober 2020]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3310951/

56. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. Nat Rev Cancer. Dezember 2013;13(12):871–82.

57. Hansen W. Neuropilin 1 guides regulatory T cells into VEGF-producing melanoma. Oncoimmunology [Internet]. 1. Februar 2013 [zitiert 24. Oktober 2020];2(2). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601175/

58. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? Scand J Immunol. Oktober 2009;70(4):326–36.

59. Roviello G, Petrioli R, Marano L, Polom K, Marrelli D, Perrella A, u. a. Angiogenesis inhibitors in gastric and gastroesophageal junction cancer. Gastric Cancer. 1. Januar 2016;19(1):31–41.

60. Davidson M, Smyth EC, Cunningham D. Clinical role of ramucirumab alone or in combination with paclitaxel for gastric and gastro-esophageal junction adenocarcinoma. OncoTargets Ther. 25. Juli 2016;9:4539–48.

61. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. J Cell Biochem. 1. Juli 2007;101(4):805–15.

62. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, u. a. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. Cell Commun Signal. 7. April 2020;18(1):59.

63. Seager RJ, Hajal C, Spill F, Kamm RD, Zaman MH. Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression. Converg Sci Phys Oncol [Internet]. 2017 [zitiert 27. Februar 2021];3. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6070160/

64. Murphy K, Weaver C. Grundbegriffe der Immunologie. Janeway Immunol. 23. April 2018;3–46.

65. Püschel G, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B, Doenecke D, u. a., Herausgeber. Taschenlehrbuch Biochemie [Internet]. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019 [zitiert 2. März 2021]. Verfügbar unter: https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-163310

66. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, u. a. Innere Medizin. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018. 1532 S. (Duale Reihe).

67. Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. Comput Struct Biotechnol J. 22. November 2018;17:1–13.

68. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. Cell Mol Life Sci. 2018;75(4):689–713.

69. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4 + T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. Cancer Gene Ther. 27. Mai 2020;1–13.

70. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? Cancer Sci. Juli 2019;110(7):2080–9.

71. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. J Cell Sci. 1. Dezember 2012;125(23):5591–6.

72. Farc O, Cristea V. An overview of the tumor microenvironment, from cells to complex networks (Review). Exp Ther Med. 1. Januar 2021;21(1):1–1.

73. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-β and the TGF-β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. Mai 2016 [zitiert 27. Februar 2021];8(5). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852809/

74. Schülke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. Front Immunol [Internet]. 19. März 2018 [zitiert 27. Februar 2021];9. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5867300/

75. Do P, Beckwith KA, Cheney C, Tran M, Beaver L, Griffin BG, u. a. Leukemic B Cell CTLA-4 Suppresses Co-stimulation of T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1. Mai 2019;202(9):2806–16.

76. Sebe A, Anliker B, Rau J, Renner M. Genetisch modifizierte regulatorische T-Zellen: Therapiekonzepte und ihr regulatorischer Rahmen. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2020;63(11):1403–11.

77. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. Front Immunol [Internet]. 2020 [zitiert 28. Februar 2021];11. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00924/full 78. Del Prete A, Sozio F, Barbazza I, Salvi V, Tiberio L, Laffranchi M, u. a. Functional Role of Dendritic Cell Subsets in Cancer Progression and Clinical Implications. Int J Mol Sci [Internet]. 30. Mai 2020 [zitiert 28. Februar 2021];21(11). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312661/

Fu C, Jiang A. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. Front Immunol [Internet]. 20. Dezember 2018 [zitiert 28. Februar 2021];9. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6306491/
Kim J, Bae J-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. Mediators Inflamm [Internet]. 2016 [zitiert 28. Februar 2021];2016. Verfügbar unter:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4757693/

 Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. Front Oncol [Internet].
 November 2019 [zitiert 28. Februar 2021];9. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6874146/

82. Barrett RL, Puré E. Cancer-associated fibroblasts and their influence on tumor immunity and immunotherapy. Kroemer G, Settleman J, Herausgeber. eLife.
28. Dezember 2020;9:e57243.

83. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, u. a. The Role of Tumor Stroma in Cancer Progression and Prognosis: Emphasis on Carcinoma-Associated Fibroblasts and Non-small Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol. 1. Januar 2011;6(1):209–17.

84. Puré E, Lo A. Can targeting stroma pave the way to enhanced antitumor immunity and immunotherapy of solid tumors? Cancer Immunol Res. April 2016;4(4):269–78.

85. Königshoff M, Brandenburger T. Kurzlehrbuch Biochemie. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2018. 428 S. (Kurzlehrbuch).

86. Horn F, Armbruster M, Berghold S, Blaeschke F, Grillhösl C, Harrasser S, u. a. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium [Internet]. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019 [zitiert 2. März 2021]. Verfügbar unter: https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-160377

87. Ulfig N, Georg Thieme Verlag KG. Kurzlehrbuch Histologie. 2019.

88. Van Herck Y, Antoranz A, Andhari MD, Milli G, Bechter O, De Smet F, u. a. Multiplexed Immunohistochemistry and Digital Pathology as the Foundation for Next-Generation Pathology in Melanoma: Methodological Comparison and Future Clinical Applications. Front Oncol. 29. März 2021;11:636681.

89. Wang N, Wang R, Zhang X, Li X, Liang Y, Ding Z. Spatially-resolved proteomics and transcriptomics: An emerging digital spatial profiling approach for tumor microenvironment. Vis Cancer Med. 2021;2:1.

90. Toki MI, Merritt CR, Wong PF, Smithy J, Kluger H, Syrigos K, u. a. High-plex predictive marker discovery for melanoma immunotherapy treated patients using Digital Spatial Profiling. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15. September 2019;25(18):5503–12.

91. Rajković N, Li X, Plataniotis KN, Kanjer K, Radulovic M, Milošević NT. The Pan-Cytokeratin Staining Intensity and Fractal Computational Analysis of Breast Tumor Malignant Growth Patterns Prognosticate the Occurrence of Distant Metastasis. Front Oncol [Internet]. 30. August 2018 [zitiert 6. Januar 2021];8. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125390/

92. Stufendiagnostik bei Verdacht auf eine Autoimmunerkrankung der Leber • Labor Enders [Internet]. Labor Enders. 2019 [zitiert 6. Januar 2021]. Verfügbar unter: https://www.labor-enders.de/2019/11/28/stufendiagnostik-bei-verdacht-aufeine-autoimmunerkrankung-der-leber/

93. Van TM, Blank CU. A user's perspective on GeoMxTM digital spatial profiling. Immuno-Oncol Technol. 1. Juli 2019;1:11–8.

94. Farren MR, Sayegh L, Ware MB, Chen H-R, Gong J, Liang Y, u. a. Immunologic alterations in the pancreatic cancer microenvironment of patients treated with neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy. JCI Insight [Internet]. 16. Januar 2020 [zitiert 6. Januar 2021];5(1). Verfügbar unter: https://insight.jci.org/articles/view/130362

95. Merritt CR, Ong GT, Church S, Barker K, Geiss G, Hoang M, u. a. High multiplex, digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue using genomic detection methods. bioRxiv. 26. Februar 2019;559021.

96. Nanostring. GeoMX Digital Spatial Profiler.

97. Kessler W. Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik [Internet]. 1. Aufl. Wiley; 2006 [zitiert 23. März 2021]. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527610037

98. Bedre R. Volcano plot in Python [Internet]. Renesh Bedre. 2018 [zitiert 2. Februar 2021]. Verfügbar unter: https://reneshbedre.com/blog/volcano.html

99. Zhao S, Guo Y, Sheng Q, Shyr Y. Advanced Heat Map and Clustering<br/>Analysis Using Heatmap3. BioMed Res Int [Internet]. 2014 [zitiert 28. April<br/>2021];2014.2021];2014.VerfügbarUnter:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124803/

100. Mukaka M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. Malawi Med J J Med Assoc Malawi. September 2012;24(3):69–71.

101. Urban D, Mayerl J. Regressionsanalyse: Theorie, Technik und Anwendung: Lehrbuch; Neu: jetzt auch mit logistischer Regression. 4., überarb. und erw. Aufl.
Wiesbaden: VS, Verl. für Sozialwiss; 2011. 368 S. (Studienskripten zur Soziologie).
102. Weiß C. Basiswissen Medizinische Statistik [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019 [zitiert 10. März 2021]. (Springer-Lehrbuch).
Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-56588-9

103. Raychaudhuri S, Stuart JM, Altman RB. PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS TO SUMMARIZE MICROARRAY EXPERIMENTS: APPLICATION TO SPORULATION TIME SERIES. Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput. 2000;455–66.

104. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. Philos Transact A Math Phys Eng Sci [Internet]. 13. April 2016 [zitiert
9. Februar 2021];374(2065). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4792409/

105. Dunne MR, Michielsen AJ, O'Sullivan KE, Cathcart MC, Feighery R, Doyle B, u. a. HLA-DR expression in tumor epithelium is an independent prognostic indicator in esophageal adenocarcinoma patients. Cancer Immunol Immunother. 2017;66(7):841–50.

106. Boross P, Leusen JHW. Mechanisms of action of CD20 antibodies. Am J Cancer Res. 20. November 2012;2(6):676–90.

107. Huang X, Zhang X, Li E, Zhang G, Wang X, Tang T, u. a. VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 29. Juni 2020;13(1):83.

108. Zhan S, Liu Z, Zhang M, Guo T, Quan Q, Huang L, u. a. Overexpression of B7-H3 in  $\alpha$ -SMA-Positive Fibroblasts Is Associated With Cancer Progression and Survival in Gastric Adenocarcinomas. Front Oncol [Internet]. 10. Januar 2020 [zitiert

4. April 2021];9. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966326/

109. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. Nat Rev Immunol. November 2017;17(11):703–17.

110. Jamiyan T, Kuroda H, Yamaguchi R, Abe A, Hayashi M. CD68- and CD163positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. Virchows Arch. 1. Dezember 2020;477(6):767–75.

111. Hu JM, Liu K, Liu JH, Jiang XL, Wang XL, Chen YZ, u. a. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predict aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. Oncotarget. 22. Februar 2017;8(13):21526–38.

112. Cheah MT, Chen JY, Sahoo D, Contreras-Trujillo H, Volkmer AK, Scheeren FA, u. a. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 14. April 2015;112(15):4725–30.

113. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. J Hematol OncolJ Hematol Oncol [Internet]. 10. Mai 2018 [zitiert 14. März 2021];11. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946470/

114. Chetty R, Gatter K. CD3: Structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. J Pathol. 1994;173(4):303–7.

115. Hu G, Wang S. Tumor-infiltrating CD45RO+ Memory T Lymphocytes PredictFavorable Clinical Outcome in Solid Tumors. Sci Rep [Internet]. 4. September 2017[zitiert7. Februar2021];7.Verfügbarhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583330/

116. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. Front Immunol [Internet]. 2018 [zitiert 15. August 2021];0. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00014/full

117. Goberdhan DCI, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. Hum Mol Genet. 15. Oktober 2003;12(suppl\_2):R239–48.

118. Wikenheiser DJ, Stumhofer JS. ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? Front Immunol [Internet]. 10. August 2016 [zitiert 7. Februar 2021];7. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4979228/

119. Courtney AH, Shvets AA, Lu W, Griffante G, Mollenauer M, Horkova V, u. a. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. Sci Signal [Internet]. 22. Oktober 2019 [zitiert 14. März 2021];12(604). Verfügbar unter: https://stke.sciencemag.org/content/12/604/eaaw8151

120. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The Significance of OX40 and OX40L to T cell Biology and Immune Disease. Immunol Rev. Mai 2009;229(1):173–91.

121. STING: a master regulator in the cancer-immunity cycle | Molecular Cancer | Full Text [Internet]. [zitiert 8. April 2021]. Verfügbar unter: https://molecularcancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-1087-y

122. Bednarczyk M, Stege H, Grabbe S, Bros M. β2 Integrins—Multi-Functional Leukocyte Receptors in Health and Disease. Int J Mol Sci [Internet]. 19. Februar
2020 [zitiert 17. März 2021];21(4). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7073085/

123. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma. Juni 2018;127(2):175–86.

124. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in cancer.J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 4. Dezember 2020;13(1):165.

125. Ghasemi F, Tessier TM, Gameiro SF, Maciver AH, Cecchini MJ, Mymryk JS. High MHC-II expression in Epstein–Barr virus-associated gastric cancers suggests that tumor cells serve an important role in antigen presentation. Sci Rep. 8. September 2020;10(1):14786.

126. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. 879 S. (Duale Reihe).

127. Mensali N, Grenov A, Pati NB, Dillard P, Myhre MR, Gaudernack G, u. a. Antigen-delivery through invariant chain (CD74) boosts CD8 and CD4 T cell immunity. Oncoimmunology. 11. Januar 2019;8(3):1558663.

128. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski T. Tumor-residing Batf3 dendritic cells are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy. Cancer Cell.
8. Mai 2017;31(5):711-723.e4.

129. The transcription factor Batf3 inhibits the differentiation of regulatory T cells in the periphery | Experimental & Molecular Medicine [Internet]. [zitiert 16. April 2021]. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/emm2017157

130. B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas | Scientific Reports [Internet]. [zitiert 4. April 2021]. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/s41598-021-84465-6

131. Nomura T, Huang W-C, Zhau HE, Josson S, Mimata H, Kaur M. β2-Microglobulin-mediated Signaling as a Target for Cancer Therapy. Anticancer Agents Med Chem. März 2014;14(3):343–52.

132. Seliger B, Jasinski-Bergner S, Quandt D, Stoehr C, Bukur J, Wach S, u. a. HLA-E expression and its clinical relevance in human renal cell carcinoma. Oncotarget. 31. August 2016;7(41):67360–72.

133. Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural Killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40 | Science [Internet]. [zitiert 4. April 2021]. Verfügbar unter: https://science.sciencemag.org/content/287/5455/1031.long

134. Correia C, Lee S-H, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KLB, Ding H, u. a. Emerging Understanding of Bcl-2 Biology: Implications for Neoplastic Progression and Treatment. Biochim Biophys Acta. Juli 2015;1853(7):1658–71.

135. Sox proteins in melanocyte development and melanoma [Internet]. [zitiert 15.August2021].Verfügbarunter:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2906668/

136. Haijes HA, Koster MJE, Rehmann H, Li D, Hakonarson H, Cappuccio G, u. a. De Novo Heterozygous POLR2A Variants Cause a Neurodevelopmental Syndrome with Profound Infantile-Onset Hypotonia. Am J Hum Genet. 1. August 2019;105(2):283–301.

137. Latham MP, Sekhar A, Kay LE. Understanding the mechanism of proteasome 20S core particle gating. Proc Natl Acad Sci. 15. April 2014;111(15):5532–7.

138. Chauvin J-M, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. J Immunother Cancer. 1. September 2020;8(2):e000957.

139. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. Nat Rev Immunol. März 2020;20(3):173–85.

140. Shan C, Li X, Zhang J. Progress of immune checkpoint LAG-3 in immunotherapy (Review). Oncol Lett. 1. November 2020;20(5):1–1.

141. Starzer AM, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy:
CD27 (TNFRSF7). ESMO Open [Internet]. 9. März 2020 [zitiert 7. April 2021];4(Suppl 3). Verfügbar unter:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7082637/

142. You J, Chen W, Chen J, Zheng Q, Dong J, Zhu Y. The Oncogenic Role of ARG1 in Progression and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. BioMed Res Int.18. September 2018;2018:e2109865.

143. Yue C, Xu J, Estioko MDT, Kotredes KP, Lopez-Otalora Y, Hilliard BA, u. a. Host STAT2/type I interferon axis controls tumor growth. Int J Cancer. 2015;136(1):117–26.

144. Meireson A, Devos M, Brochez L. IDO Expression in Cancer: DifferentCompartment, Different Functionality? Front Immunol [Internet]. 2020 [zitiert 28.März2021];11.Verfügbarunter:https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.531491/full

145. Zhao S, Shen W, Yu J, Wang L. TBX21 predicts prognosis of patients and drives cancer stem cell maintenance via the TBX21–IL-4 pathway in lung adenocarcinoma. Stem Cell Res Ther [Internet]. 3. April 2018 [zitiert 27. April 2021];9. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5883886/

146. Zhang Y, Liu Z. STAT1 in Cancer: Friend or Foe? Discov Med. 27. August 2017;24(130):19–29.

147. Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, Kalinsky K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. Br J Clin Pharmacol. Oktober 2016;82(4):943–56.

148. Lee H, Jeong AJ, Ye S-K. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. BMB Rep. Juli 2019;52(7):415–23.

149. Xie J, Yan Y, Liu F, Kang H, Xu F, Xiao W, u. a. Knockdown of Rab7a suppresses the proliferation, migration, and xenograft tumor growth of breast cancer

cells. Biosci Rep [Internet]. 5. Februar 2019 [zitiert 11. Februar 2021];39(2). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6361774/

150. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, Cancer Progression and Opportunities in Cancer Treatment. J Mol Med Berl Ger. Dezember 2016;94(12):1313–26.

151. Xiao Q, Wu J, Wang W-J, Chen S, Zheng Y, Yu X, u. a. DKK2 imparts tumor immunity evasion through  $\beta$ -catenin-independent suppression of cytotoxic immune cell activation. Nat Med. März 2018;24(3):262–70.

152. Schuster IS, Andoniou CE. NKG7 – regulating endosomal pathways? Immunol Cell Biol. 2020;98(10):802–4.

153. Hurkmans DP, Basak EA, Schepers N, Hoop EO-D, Leest CHV der, Bouazzaoui SE, u. a. Granzyme B is correlated with clinical outcome after PD-1 blockade in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. J Immunother Cancer. 1. Mai 2020;8(1):e000586.

154. Sun Y, Bao X, Ren Y, Jia L, Zou S, Han J, u. a. Targeting HDAC/OAZ1 axis with a novel inhibitor effectively reverses cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. Cell Death Dis [Internet]. 24. Mai 2019 [zitiert 4. April 2021];10(6). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6534535/

155. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. Blood. 4. Januar 2018;131(1):58–67.

156. Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis S-NC. Targeting CD40L: a Promising Therapeutic Approach. Clin Diagn Lab Immunol. 1. Juli 2004;11(4):635–41.

157. Fagerholm SC, Guenther C, Llort Asens M, Savinko T, Uotila LM. Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. Front Immunol [Internet]. 19. Februar 2019 [zitiert

17.März2021];10.Verfügbarunter:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6389632/

158. Abraham V, Cao G, Parambath A, Lawal F, Handumrongkul C, Debs R, u. a. Involvement of TIMP-1 in PECAM-1-mediated tumor dissemination. Int J Oncol. 25. Mai 2018;53(2):488–502.

159. Fagerholm SC, Guenther C, Llort Asens M, Savinko T, Uotila LM. Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. Front Immunol [Internet]. 2019 [zitiert 18. März 2021];10. Verfügbar unter:

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00254/full
160. Cheuk IW-Y, Siu MT, Ho JC-W, Chen J, Shin VY, Kwong A. ITGAV targeting as a therapeutic approach for treatment of metastatic breast cancer. Am J Cancer Res. 1. Januar 2020;10(1):211–23.

161. Huang C-Y, Ye Z-H, Huang M-Y, Lu J-J. Regulation of CD47 expression in cancer cells. Transl Oncol. 1. Dezember 2020;13(12):100862.

162. Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg A-M, Ries CH, Rüttinger D. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. J Immunother Cancer. 18. Juli 2017;5(1):53.

163. Ding Q, Lu P, Xia Y, Ding S, Fan Y, Li X, u. a. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. Cancer Med. 10. Oktober 2016;5(11):3246–59.

164. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemokine-like Receptor 1 (CMKLR1) and Chemokine (C-C motif) Receptor-like 2 (CCRL2); Two Multifunctional Receptors with Unusual Properties. Exp Cell Res. 10. März 2011;317(5):674–84.

165. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm Sin B. September 2015;5(5):378–89.

166. Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. BMB Rep. März 2014;47(3):122–9.

167. Kim TH, Kim SG. Role of CXCR6 in Antitumor Immune Surveillance. Gastroenterology. Mai 2019;156(6):1565–8.

168. Aldinucci D, Colombatti A. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. Mediators Inflamm [Internet]. 2014 [zitiert 6. April 2021];2014. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910068/

169. Chonov DC, Ignatova MMK, Ananiev JR, Gulubova MV. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. Open Access Maced J Med Sci. 20. Juli 2019;7(14):2391–8.

170. Berraondo P, Etxeberria I, Ponz-Sarvise M, Melero I. Revisiting Interleukin-12 as a Cancer Immunotherapy Agent. Clin Cancer Res. 15. Juni 2018;24(12):2716–8.

171. Ma H, Yang W, Zhang L, Liu S, Zhao M, Zhou G, u. a. Interferon-alpha promotes immunosuppression through IFNAR1/STAT1 signalling in head and neck squamous cell carcinoma. Br J Cancer. Februar 2019;120(3):317–30.

172. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review) [Internet]. [zitiert 15. August 2021]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3406435/

173. Robinson TO, Schluns KS. The potential and promise of IL-15 in immunooncogenic therapies. Immunol Lett. Oktober 2017;190:159–68.

174. Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1. März 2013;19(5):1035–43.

175. Owen-Schaub LB. Fas function and tumor progression: Use it and lose it. Cancer Cell. 1. August 2002;2(2):95–6.

176. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. Front Immunol. 2019;10:1818.

177. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. Cancer Med. 23. Juli 2018;7(9):4509–16.

178. Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review | Biomarker Research | Full Text [Internet]. [zitiert 15. August 2021]. Verfügbar unter: https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-020-00228-x

179. Mohtar MA, Syafruddin SE, Nasir SN, Yew LT. Revisiting the Roles of Pro-Metastatic EpCAM in Cancer. Biomolecules [Internet]. 7. Februar 2020 [zitiert 2. April 2021];10(2). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072682/

180. Fang J, Wang H, Liu Y, Ding F, Ni Y, Shao S. High KRT8 expression promotes tumor progression and metastasis of gastric cancer. Cancer Sci. Februar 2017;108(2):178–86.

181. Scarpa ES, Tasini F, Crinelli R, Ceccarini C, Magnani M, Bianchi M. The Ubiquitin Gene Expression Pattern and Sensitivity to UBB and UBC Knockdown Differentiate Primary 23132/87 and Metastatic MKN45 Gastric Cancer Cells. Int J Mol Sci [Internet]. 30. Juli 2020 [zitiert 10. Februar 2021];21(15). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7432825/

182. Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. Februar 2013 [zitiert 16. März 2021];5(2). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552500/

183. Boross P, Leusen JHW. Mechanisms of action of CD20 antibodies. Am J Cancer Res. 20. November 2012;2(6):676–90.

184. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. Haematologica. Juni 2020;105(6):1494–506.

185. Zhang S, Hu B, Lv X, Chen S, Liu W, Shao Z. The Prognostic Role of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Pathway in Patients With Solid Tumors: A Meta-Analysis. Front Oncol [Internet]. 2019 [zitiert 27. April 2021];9. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00390/full

186. Wan YCE, Liu J, Chan KM. Histone H3 Mutations in Cancer. Curr Pharmacol Rep. 2018;4(4):292–300.

187. AKT as a Therapeutic Target for Cancer | Cancer Research [Internet]. [zitiert
15. August 2021]. Verfügbar unter: https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/6/1019

188. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya J-M. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation [Internet]. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. El Rosario University Press; 2013 [zitiert 15. August 2021]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/

189. Large TYSL, Mantini G, Meijer LL, Pham TV, Funel N, Grieken NCT van, u. a. Microdissected pancreatic cancer proteomes reveal tumor heterogeneity and therapeutic targets. JCI Insight [Internet]. 6. August 2020 [zitiert 28. Oktober 2021];5(15). Verfügbar unter: https://insight.jci.org/articles/view/138290

190. Qian J, Olbrecht S, Boeckx B, Vos H, Laoui D, Etlioglu E, u. a. A pan-cancer blueprint of the heterogeneous tumor microenvironment revealed by single-cell profiling. Cell Res. September 2020;30(9):745–62.

191. Meng C, Zeleznik OA, Thallinger GG, Kuster B, Gholami AM, Culhane AC. Dimension reduction techniques for the integrative analysis of multi-omics data. Brief Bioinform. Juli 2016;17(4):628–41.

192. Son K, Yu S, Shin W, Han K, Kang K. A Simple Guideline to Assess the Characteristics of RNA-Seq Data. BioMed Res Int. 4. November 2018;2018:2906292.

193. Chen X, Zhang B, Wang T, Bonni A, Zhao G. Robust principal component analysis for accurate outlier sample detection in RNA-Seq data. BMC Bioinformatics. 29. Juni 2020;21:269.

194. Grünwald BT, Devisme A, Andrieux G, Vyas F, Aliar K, McCloskey CW, u. a. Spatially confined sub-tumor microenvironments orchestrate pancreatic cancer pathobiology [Internet]. 2021 Feb [zitiert 29. Oktober 2021] S. 2021.02.18.431890. Verfügbar unter: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.18.431890v1

195. He J, Maurer HC, Holmstrom SR, Su T, Ahmed A, Hibshoosh H, u. a. Transcriptional deconvolution reveals consistent functional subtypes of pancreatic cancer epithelium and stroma [Internet]. 2018 März [zitiert 29. Oktober 2021] S. 288779. Verfügbar unter: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/288779v1

196. Maurer C, Holmstrom S, He J, Laise P, Su T, Ahmed A, u. a. Experimental microdissection enables functional harmonization of pancreatic cancer subtypes. Gut. Juni 2019;68(6):1034–43.

197. Romanens L, Chaskar P, Tille J-C, Ryser S, Liaudet N, Hu-Heimgartner K,u. a. Spatial transcriptomics of tumor microenvironment in formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer [Internet]. 2020 Feb [zitiert 29. Oktober 2021] S.2020.01.31.928143.Verfügbarunter:

https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.31.928143v1

198. Ong C-AJ, Tan QX, Lim HJ, Shannon NB, Lim WK, Hendrikson J, u. a. An Optimised Protocol Harnessing Laser Capture Microdissection for Transcriptomic Analysis on Matched Primary and Metastatic Colorectal Tumours. Sci Rep. 20. Januar 2020;10:682.

199. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell.4. März 2011;144(5):646–74.

200. Jin M-Z, Jin W-L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. Signal Transduct Target Ther. 25. August 2020;5(1):1–16.

201. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. Dev Cell. 15. Juni 2010;18(6):884–901.

202. Davern M, Donlon NE, Power R, Hayes C, King R, Dunne MR, u. a. The tumour immune microenvironment in oesophageal cancer. Br J Cancer. 26. April 2021;1–16.

203. Huang T-X, Fu L. The immune landscape of esophageal cancer. Cancer Commun. 26. November 2019;39(1):79.

204. Davidson M, Chau I, Cunningham D, Khabra K, Iveson T, Hickish T, u. a. Impact of tumour histological subtype on chemotherapy outcome in advanced oesophageal cancer. World J Gastrointest Oncol. 15. August 2017;9(8):333–40.

205. Savino A, De Marzo N, Provero P, Poli V. Meta-Analysis of Microdissected Breast Tumors Reveals Genes Regulated in the Stroma but Hidden in Bulk Analysis. Cancers. Januar 2021;13(13):3371. 206. Monkman J, Taheri T, Ebrahimi Warkiani M, O'Leary C, Ladwa R, Richard D, u. a. High-Plex and High-Throughput Digital Spatial Profiling of Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). Cancers. 27. November 2020;12(12):3551.

207. Liu D, He MX, Bi K, Van Allen EM, Liu D. Modeling differentially expressed genes in patient tumors to guide expression-based biomarker development. J Clin Oncol. 20. Mai 2020;38(15\_suppl):3627–3627.

208. Barber H, Tofias A, Lander B, Daniels A, Gong J, Ren Y, u. a. Advanced Molecular Characterization Using Digital Spatial Profiling Technology on Immunooncology Targets in Methylated Compared with Unmethylated IDH-Wildtype Glioblastoma. J Oncol. 24. Februar 2021;2021:8819702.

209. Winslow S, Lindquist KE, Edsjö A, Larsson C. The expression pattern of matrix-producing tumor stroma is of prognostic importance in breast cancer. BMC Cancer. 4. November 2016;16(1):841.

210. Mao Y, Shen J, Lu Y, Lin K, Wang H, Li Y, u. a. RNA sequencing analyses reveal novel differentially expressed genes and pathways in pancreatic cancer. Oncotarget. 22. März 2017;8.

211. Etzerodt A, Tsalkitzi K, Maniecki M, Damsky W, Delfini M, Baudoin E, u. a. Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell–mediated tumor regression. J Exp Med. 7. Oktober 2019;216(10):2394–411.

212. Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of CD163+ Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. Int J Mol Sci [Internet]. 31. Juli 2020 [zitiert 14. März 2021];21(15). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7432735/

213. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. Front Cell Dev Biol [Internet]. 7. März 2017 [zitiert 27. März 2021];5. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5339222/

214. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4 + T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. Cancer Gene Ther. Februar 2021;28(1):5–17.

215. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4 + T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. Cancer Gene Ther. 27. Mai 2020;1–13.

216. Saleh R, Elkord E. FoxP3+ T regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets. Cancer Lett. 10. Oktober 2020;490:174–85.

217. Laidlaw BJ, Craft J, Kaech SM. The multifaceted role of CD4+ T cells in the regulation of CD8+ T cell memory maturation. Nat Rev Immunol. Februar 2016;16(2):102–11.

218. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. Immunity. 1. Februar 2006;24(2):133–9.

219. Hu G, Wang S. Tumor-infiltrating CD45RO + Memory T Lymphocytes Predict Favorable Clinical Outcome in Solid Tumors. Sci Rep. 4. September 2017;7(1):10376.

220. Devi M, Vijayalakshmi D, Dhivya K, Janane M. Memory T Cells (CD45RO) Role and Evaluation in Pathogenesis of Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. J Clin Diagn Res JCDR. Mai 2017;11(5):ZC84–6.

221. Amedei A, Della Bella C, Silvestri E, Prisco D, D'Elios MM. T Cells in Gastric Cancer: Friends or Foes. Clin Dev Immunol. 31. Mai 2012;2012:e690571.

222. Ning Z-K, Hu C-G, Huang C, Liu J, Zhou T-C, Zong Z. Molecular Subtypes and CD4+ Memory T Cell-Based Signature Associated With Clinical Outcomes in Gastric Cancer. Front Oncol. 17. März 2021;10:626912.

223. Lownik JC, Conrad DH, Martin RK. T cell receptor signaling defines the fate and pathway of ICOS internalization. Biochem Biophys Rep [Internet]. 10. September 2020 [zitiert 7. Februar 2021];24. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7494666/

224. Amatore F, Ortonne N, Lopez M, Orlanducci F, Castellano R, Ingen-Housz-Oro S, u. a. ICOS is widely expressed in cutaneous T-cell lymphoma, and its targeting promotes potent killing of malignant cells. Blood Adv. 23. Oktober 2020;4(20):5203–14.

225. Solinas C, Gu-Trantien C, Willard-Gallo K. The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. ESMO Open.
1. Januar 2020;5(1):e000544.

226. Oliviero M, Massimo N, Maria BM, Luciana T, Consuelo A, Giorgio S. ICOS-L as a Potential Therapeutic Target for Cancer Immunotherapy. Curr Protein Pept Sci. 31. Oktober 2018;19(11):1107–13. 227. Wu J, Wu H, An J, Ballantyne CM, Cyster JG. Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. Proc Natl Acad Sci. 26. Juni 2018;115(26):6786–91.

228. Golinski M-L, Demeules M, Derambure C, Riou G, Maho-Vaillant M, Boyer O, u. a. CD11c+ B Cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. Front Immunol [Internet]. 25. Februar 2020 [zitiert 8. Februar 2021];11. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7051942/

229. Wang Y, Xu B, Hu W-W, Chen L-J, Wu C-P, Lu B-F, u. a. High expression of CD11c indicates favorable prognosis in patients with gastric cancer. World J Gastroenterol WJG. 21. August 2015;21(31):9403–12.

230. Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. Curr Opin Cell Biol. Oktober 2007;19(5):529–33.

231. Ma L, Mauro C, Cornish GH, Chai J-G, Coe D, Fu H, u. a. Ig gene-like molecule CD31 plays a nonredundant role in the regulation of T-cell immunity and tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A. 9. November 2010;107(45):19461–6.

232. Woodfin Abigail, Voisin Mathieu-Benoit, Nourshargh Sussan. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1. Dezember 2007;27(12):2514–23.

233. Yue Q, Wang F, Cao F, Duan X, Bai J. PECAM-1 is a prognostic-related biomarker and correlated with immune infiltrates in breast cancer [Internet]. 2021 [zitiert 1. August 2021]. Verfügbar unter: https://www.researchsquare.com/article/rs-451009/v1

234. Hume DA, MacDonald KPA. Therapeutic applications of macrophage colonystimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. Blood. 23. Februar 2012;119(8):1810–20.

235. Gambardella V, Castillo J, Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Martínez-Ciarpaglini C, Cabeza-Segura M, u. a. The role of tumor-associated macrophages in gastric cancer development and their potential as a therapeutic target. Cancer Treat Rev. 1. Juni 2020;86:102015.

236. Lin W, Xu D, Austin CD, Caplazi P, Senger K, Sun Y, u. a. Function of CSF1 and IL34 in Macrophage Homeostasis, Inflammation, and Cancer. Front Immunol [Internet]. 4. September 2019 [zitiert 13. Februar 2021];10. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6736990/

237. Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg A-M, Ries CH, Rüttinger D. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. J Immunother Cancer [Internet]. 18. Juli 2017 [zitiert 29. März 2021];5. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514481/

238. Edwards V DK, Sweeney DT, Ho H, Eide CA, Rofelty A, Agarwal A, u. a. Targeting of colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) in the CLL microenvironment yields antineoplastic activity in primary patient samples. Oncotarget. 15. Mai 2018;9(37):24576–89.

239. O'Brien SA, Orf J, Skrzypczynska KM, Tan H, Kim J, DeVoss J, u. a. Activity of tumor-associated macrophage depletion by CSF1R blockade is highly dependent on the tumor model and timing of treatment. Cancer Immunol Immunother [Internet].
29. Januar 2021 [zitiert 29. März 2021]; Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/s00262-021-02861-3

240. Liu H, Zhang H, Shen Z, Lin C, Wang X, Qin J, u. a. Increased Expression of CSF-1 Associates With Poor Prognosis of Patients With Gastric Cancer Undergoing Gastrectomy. Medicine (Baltimore). 7. März 2016;95(9):e2675.

241. Yeo J, Ko M, Lee D-H, Park Y, Jin H. TIGIT/CD226 Axis Regulates Anti-<br/>Tumor Immunity. Pharmaceuticals [Internet]. 28. Februar 2021 [zitiert 1. April<br/>2021];14(3).2021];14(3).Verfügbar

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7997242/

242. TIGIT and PD-1 may serve as potential prognostic biomarkers for gastric cancer - ScienceDirect [Internet]. [zitiert 2. November 2021]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0171298519302657?via%3 Dihub

243. Rotte A, Sahasranaman S, Budha N. Targeting TIGIT for Immunotherapy of Cancer: Update on Clinical Development. Biomedicines. 21. September 2021;9(9):1277.

244. He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. OncoTargets Ther. 2018;11:7005.

245. Yu J, Zhang H, Sun S, Sun S, Li L. The effects of Tim-3 activation on T-cells in gastric cancer progression. Oncol Lett. Februar 2019;17(2):1461–6.

246. Dawes R, Petrova S, Liu Z, Wraith D, Beverley PCL, Tchilian EZ. Combinations of CD45 Isoforms Are Crucial for Immune Function and Disease. J Immunol Baltim Md 1950. 15. März 2006;176(6):3417–25.

247. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Lab Invest. Januar 2017;97(1):4–13.

248. Mohamed O, El Bastawisy A, Allahlobi N, Abdellateif MS, Zekri ARN, Shaarawy S, u. a. The role of CD68+ macrophage in classical Hodgkin lymphoma patients from Egypt. Diagn Pathol [Internet]. 4. Februar 2020 [zitiert 27. März 2021];15. Verfügbar unter:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7001371/

249. Aldinucci D, Borghese C, Casagrande N. The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression. Cancers [Internet]. 2. Juli 2020 [zitiert 6. April 2021];12(7). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407580/

250. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. 879 S. (Duale Reihe).

251. Hiddemann W, Herausgeber. Spezieller Teil: solide Tumoren, Lymphome, Leukämien; mit 483 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2010. 796 S. (Die Onkologie).

252. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. Cell Death Differ. April 2010;17(4):616–23.

253. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. Cell Death Differ. April 2010;17(4):616–23.

254. Pérez-Pena J, Tibor Fekete J, Páez R, Baliu-Piqué M, García-Saenz JÁ, García-Barberán V, u. a. A Transcriptomic Immunologic Signature Predicts Favorable Outcome in Neoadjuvant Chemotherapy Treated Triple Negative Breast Tumors. Front Immunol [Internet]. 2019 [zitiert 24. Juli 2021];0. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02802/full

255. Klintman M, Buus R, Cheang MCU, Sheri A, Smith IE, Dowsett M. Changes in Expression of Genes Representing Key Biologic Processes after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer, and Prognostic Implications in Residual Disease. Clin Cancer Res. 15. Mai 2016;22(10):2405–16.

256. Shirakawa Y, Hide T, Yamaoka M, Ito Y, Ito N, Ohta K, u. a. Ribosomal protein S6 promotes stem-like characters in glioma cells. Cancer Sci. Juni 2020;111(6):2041–51.

257. Gao M, Wang H, Chen X, Cao W, Fu L, Li Y, u. a. Aberrant modulation of ribosomal protein S6 phosphorylation confers acquired resistance to MAPK

pathway inhibitors in BRAF-mutant melanoma. Acta Pharmacol Sin. Februar 2019;40(2):268–78.

258. Wittenberg AD, Azar S, Klochendler A, Stolovich-Rain M, Avraham S, Birnbaum L, u. a. Phosphorylated Ribosomal Protein S6 Is Required for Akt-Driven Hyperplasia and Malignant Transformation, but Not for Hypertrophy, Aneuploidy and Hyperfunction of Pancreatic β-Cells. PLoS ONE [Internet]. 26. Februar 2016 [zitiert 7. Februar 2021];11(2). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4769037/

259. Balasuriya N, Davey NE, Johnson JL, Liu H, Biggar KK, Cantley LC, u. a. Phosphorylation-dependent substrate selectivity of protein kinase B (AKT1). J Biol Chem. 12. Juni 2020;295(24):8120–34.

260. Alwhaibi A, Verma A, Adil MS, Somanath PR. The unconventional role of Akt1 in the advanced cancers and in diabetes-promoted carcinogenesis. Pharmacol Res. Juli 2019;145:104270.

261. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. September 2012 [zitiert 12. Februar 2021];4(9). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3428770/

262. Kang BW, Chau I. Molecular target: pan-AKT in gastric cancer. ESMO Open.18. September 2020;5(5):e000728.

263. Zhai L, Ladomersky E, Lenzen A, Nguyen B, Patel R, Lauing KL, u. a. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. Cell Mol Immunol. Mai 2018;15(5):447–57.

264. Rébé C, Ghiringhelli F. STAT3, a Master Regulator of Anti-Tumor Immune Response. Cancers. September 2019;11(9):1280.

265. Li F, Zhang R, Li S, Liu J. IDO1: An important immunotherapy target in cancer treatment. Int Immunopharmacol. 1. Juni 2017;47:70–7.

266. Liu M, Wang X, Wang L, Ma X, Gong Z, Zhang S, u. a. Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 2. August 2018;11(1):100.

267. Jiao R, Zheng X, Sun Y, Feng Z, Song S, Ge H. IDO1 Expression Increased After Neoadjuvant Therapy Predicts Poor Pathologic Response and Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Front Oncol [Internet]. 2020 [zitiert 24. Juli 2021];0. Verfügbar unter:

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01099/full

268. Qin J-J, Yan L, Zhang J, Zhang W-D. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. J Exp Clin Cancer Res CR [Internet]. 14. Mai 2019 [zitiert 7. Februar 2021];38. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6518732/

269. Galoczova M, Coates P, Vojtesek B. STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63. Cell Mol Biol Lett [Internet]. 22. März 2018 [zitiert 7. Februar 2021];23. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863838/

270. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. Nat Rev Clin Oncol. April 2018;15(4):234–48.

271. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Orouei S, Zarrin V, Rahmani Moghadam E, Zabolian A, u. a. STAT3 Pathway in Gastric Cancer: Signaling, Therapeutic Targeting and Future Prospects. Biology. 12. Juni 2020;9(6):126.

272. Zhao Y, Zhang D. Biomarker Alteration to Neoadjuvant Chemotherapy Predict Pathological Response and Prognosis in Breast Cancer Patients. Cancer Genet Epigenetics. 1. Januar 2018;

273. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. Semin Reprod Med. September 2009;27(5):351–7.

274. Al Aboud NM, Tupper C, Jialal I. Genetics, Epigenetic Mechanism. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [zitiert 31. Oktober 2021]. Verfügbar unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532999/

275. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. Circulation. 17. Mai 2011;123(19):2145–56.

276. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. Heredity. Juli 2010;105(1):4–13.

277. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system | Scientific Reports [Internet]. [zitiert 31. Oktober 2021]. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/srep10775

278. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. Nat Rev Genet. 13. März 2012;13(4):227–32.

279. Meacham CE, Morrison SJ. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature. 19. September 2013;501(7467):328–37.

280. Nakamura Y, Kawazoe A, Lordick F, Janjigian YY, Shitara K. Biomarkertargeted therapies for advanced-stage gastric and gastro-oesophageal junction cancers: an emerging paradigm. Nat Rev Clin Oncol. August 2021;18(8):473–87.

281. Ramón y Cajal S, Sesé M, Capdevila C, Aasen T, De Mattos-Arruda L, Diaz-Cano SJ, u. a. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. J Mol Med Berl Ger. 2020;98(2):161–77.

282. Li M, Zhang Z, Li L, Wang X. An algorithm to quantify intratumor heterogeneity based on alterations of gene expression profiles. Commun Biol. 11. September 2020;3(1):1–19.

283. Baslan T, Kendall J, Volyanskyy K, McNamara K, Cox H, D'Italia S, u. a. Novel insights into breast cancer copy number genetic heterogeneity revealed by single-cell genome sequencing. eLife. 9:e51480.

284. Brady L, Kriner M, Coleman I, Morrissey C, Roudier M, True LD, u. a. Interand intra-tumor heterogeneity of metastatic prostate cancer determined by digital spatial gene expression profiling. Nat Commun. 3. März 2021;12(1):1426.

285. Battaglin F, Naseem M, Puccini A, Lenz H-J. Molecular biomarkers in gastroesophageal cancer: recent developments, current trends and future directions. Cancer Cell Int. 11. Juli 2018;18:99.

286. Duan Q, Tang C, Ma Z, Chen C, Shang X, Yue J, u. a. Genomic Heterogeneity and Clonal Evolution in Gastroesophageal Junction Cancer Revealed by Single Cell DNA Sequencing. Front Oncol [Internet]. 2021 [zitiert 1. August 2021];0. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.672020/full

287. Peng XL, Moffitt RA, Torphy RJ, Volmar KE, Yeh JJ. De novo compartment deconvolution and weight estimation of tumor samples using DECODER. Nat Commun. 18. Oktober 2019;10(1):4729.

288. Qin Y, Zhang W, Sun X, Nan S, Wei N, Wu H-J, u. a. Deconvolution of heterogeneous tumor samples using partial reference signals. PLoS Comput Biol.
30. November 2020;16(11):e1008452.

289. Fu T, Dai L-J, Wu S-Y, Xiao Y, Ma D, Jiang Y-Z, u. a. Spatial architecture of the immune microenvironment orchestrates tumor immunity and therapeutic response. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 25. Juni 2021;14(1):98.

290. Cao J, Gong J, Li X, Hu Z, Xu Y, Shi H, u. a. Unsupervised Hierarchical Clustering Identifies Immune Gene Subtypes in Gastric Cancer. Front Pharmacol

[Internet]. 2021 [zitiert 30. Juli 2021];0. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.692454/full

291. Hummel M, Edelmann D, Kopp-Schneider A. Clustering of samples and variables with mixed-type data. PLOS ONE. 28. November 2017;12(11):e0188274. 292. Guo X, Tang Y, Zhu W. Distinct esophageal adenocarcinoma molecular subtype has subtype-specific gene expression and mutation patterns. BMC Genomics. Dezember 2018;19(1):769.

293. Vizeacoumar FS, Guo H, Dwernychuk L, Zaidi A, Freywald A, Wu F-X, u. a. Mining the plasma-proteome associated genes in patients with gastro-esophageal cancers for biomarker discovery. Sci Rep. 7. April 2021;11(1):7590.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klinische Klassifikation der Ösophaguskarzinome		
	einschließlich der Karzinome des gastroösophagealen		
	Übergangs nach der siebten TNM-Edition (19)	- 10 -	
Tabelle 2: Sta	dieneinteilung des Ösophaguskarzinoms nach der siebten		
	Auflage der UICC (2009). (19)	- 11 -	
Tabelle 3: Übe	ersicht der Visualisierungsmarker	- 31 -	
Tabelle 4: Üb	persicht des immuno-onkologischen Panels auf Protein-		
	Ebene	- 31 -	
Tabelle 5: Übe	ersicht des immuno-onkologischen Panels auf RNA-Ebene		
		- 32 -	
Tabelle 6: Übe	ersicht der Housekeeping Gene	- 35 -	
Tabelle 7: Übe	ersicht der überexprimierten Marker auf Protein-Ebene im		
	Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe	- 44 -	
Tabelle 8: Übe	ersicht der überexprimierten Marker auf Protein-Ebene im		
	Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe. Die		
	kursiv gekennzeichneten Protein-Expressionen werden		
	nach neoadjuvanter Vorbehandlung nicht mehr		
	signifikant exprimiert	- 45 -	
Tabelle 9: Übe	ersicht der überexpremierten Marker auf RNA-Ebene im		
	Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe. Die		
	kursiv gekennzeichneten RNA-Expressionen werden		
	nach neoadjuvanter Vorbehandlung nicht mehr		
	signifikant exprimiert	- 46 -	
Tabelle 10: Üb	bersicht der überexpremierten Marker auf RNA-Ebene im		
	Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe. Die		
	kursiv gekennzeichneten RNA-Expressionen werden		
	nach der neoadjuvanten Vorbehandlung nicht mehr		
	signifikant exprimiert	- 50 -	
Tabelle 11: Übersicht der überexpremierten Marker auf Protein-Ebene			
	im Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe nach		
	neoadjuvanter Vorbehandlung. Die kursiv		

gekennzeichneten Protein-Expressionen sind in der	
neoadjuvanten Vorbehandlung hinzugekommen	- 54 -
Tabelle 12: Übersicht der überexpremierten Marker auf Protein-Ebene	
im Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe nach	
neoadjuvanter Vorbehandlung	- 56 -
Tabelle 13: Übersicht der überexprimierten Marker auf RNA-Ebene im	
Stromagewebe gegenüber dem Tumorgewebe nach	
neoadjuvanter Vorbehandlung	- 56 -
Tabelle 14: Übersicht der überexprimierten Marker auf RNA-Ebene im	
Tumorgewebe gegenüber dem Stromagewebe nach	
neoadjuvanter Vorbehandlung	- 60 -

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1	: Klassifikation des Adenokarzinomes des	
		gastroösophagealen Übergangs nach Siewert. Quelle:	
		Eigene Darstellung	8 -
Abbildung 2	2: At	blauf der DSP-Methode	30 -
Abbildung 3	3: Au	usgewählte ROIs in drei Proben des TMAs	37 -
Abbildung 4	l: Ei	ne ROI bestehend aus Tumor- und Stromagewebe	37 -
Abbildung 5	5: PC	CA-Plot der Protein-Expression	39 -
Abbildung 6	6: PC	CA-Plot der RNA-Expression	39 -
Abbildung	7:	Darstellung der quantitativen Messung der Protein-	
		Expressionen im Volcano-Plot	42 -
Abbildung	8:	Darstellung der quantitativen Messung der RNA-	
		Expressionen im Volcano-Plot	43 -
Abbildung	9:	Darstellung der quantitativen Messung der Protein-	
		Expressionen nach neoadjuvanter Vorbehandlung im	
		Volcano-Plot	52 -
Abbildung	10:	Darstellung der quantitativen Messung der RNA-	
		Expressionen nach neoadjuvanter Vorbehandlung im	
		Volcano-Plot	53 -
Abbildung 1	11: E	Ein Präparat mit zwei ausgewählten ROIs	61 -
Abbildung <sup>2</sup>	12: `	Vergleich der Expressionen der Biomarker auf Protein-	
		Ebene im Tumor- und Stromagewebe in jeweils zwei	
		ROIs derselben Probe	63 -
Abbildung	13:	Vergleich der Expressionen der Biomarker auf RNA-	
		Ebene im Tumor- und Stromagewebe in jeweils zwei	
		ROIs derselben Probe	65 -
Abbildung 1	4: C	Cluster Heatmap der differentiellen Protein-Expressionen.	
			66 -
Abbildung <sup>2</sup>	15a	und b: Darstellung der zehn stärksten überexprimierten	
		Expressionen im Stroma gegenüber dem Tumorgewebe	
		auf Protein-Ebene. Die stärksten exprimierten	
		Expressionen wurden fett gekennzeichnet	69 -

## Danksagung

Herrn PD Dr. med Richard Hummel möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen. Vielen Dank für die Unterstützung und das unermüdliche Engagement. Ihre hervorragende Betreuung hat diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht.

Vielen Dank auch an meine Schwestern, die mich während der intensiven Zeit unterstützt und ermutigt haben. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern: Danke Mama und Papa- euch verdanke ich so viel und noch mehr.