

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

PD-1 Expression beeinflusst den prognostischen Wert von  
Tumor infiltrierenden Lymphozyten bei Patienten mit  
Adenokarzinomen des Magens

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michelle Pöttsch

aus Berlin

Datum der Promotion: 17. September 2021

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Abstracts English/Deutsch</b> .....	<b>4</b>
Abstract English .....	4
Abstrakt Deutsch .....	5
<b>3. Darstellung des Forschungsstandes</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Vertiefte Schilderung der Methodik</b> .....	<b>11</b>
Patientenkollektiv .....	11
Genehmigung und Datenschutz .....	11
Gewebeproben.....	11
Tissuemicroarray und Immunhistochemie .....	12
Statistik.....	13
<b>5. Wesentliche neue Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
Klinische Merkmale .....	17
Morphologische Eigenschaften .....	17
Lokalisation .....	18
MMR-Status .....	18
CD3-, CD4- und CD8-Expression.....	19
PD-L1- und PD-1-Expression.....	20
<b>6. Klinische Anwendung</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Limitationen der eigenen Arbeit</b> .....	<b>35</b>
<b>8. Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen</b> .....	<b>37</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>38</b>
<b>10. Eidesstaatliche Erklärung</b> .....	<b>43</b>
<b>11. Eigenanteil an der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>44</b>
<b>12. Auszug aus der Journal Summary List</b> .....	<b>45</b>
<b>13. Druckexemplar der ausgewählten Publikation</b> .....	<b>48</b>
<b>14. Lebenslauf</b> .....	<b>58</b>
<b>15. Publikationsliste</b> .....	<b>60</b>
<b>16. Danksagung</b> .....	<b>61</b>

## **1. Abkürzungsverzeichnis**

TILs = Tumor infiltrierende Lymphozyten

AGÖ/M = Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs und des Magens

PD-1 = Programmed cell death protein 1

PD-L1 = Programmed cell death 1 ligand 1

MMR = mismatch-repair

MSI = Mikrosatelliteninstabilität

MSS = Mikrosatellitenstabilität

## 2. Abstracts

### Abstract English

**Introduction:** *The interaction between the immune system and tumor tissue and its impact on prognosis in patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and stomach (AGE/S) is provoking increasing interest. This study analyzes for the first time the prognostic impact of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and checkpoint inhibitors in a large Caucasian cohort in patients with AGE/S.*

**Methods:** *Tissue samples from 438 therapy naïve patients with AGE/S undergoing surgery between 1992 and 2004, were studied in a tissue micro array (TMA). TMAs were stained with antibodies against human CD3, CD4, CD8, PD-1 and PD-L1 and the abundance of Tils was determined per 1mm<sup>2</sup> tumor tissue. Subsequently, the amount of lymphocyte infiltration was correlated to the overall survival of patients.*

**Results:** *High infiltration with tumor infiltrating lymphocytes (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> TILs) was a prognostic marker for an increased overall survival of AGE/S patients when compared to individuals with low T cell count (CD3: 106.04 months vs. 64.38 months;  $p=0.002$ ; CD4: 116.92 months vs. 56.36 months;  $p<0.001$ ; CD8: 101.53 months vs. 67.34 months;  $p=0.016$ ). High infiltration with CD3<sup>+</sup> lymphocytes was associated with an increased survival in multivariate analysis (HR: 0.326;  $p=0.023$ ). Subgroup analyses revealed that the tumor stage and CD3<sup>+</sup> TIL state were correlating strongly and could serve as a prognostic marker for the clinical outcome of AGE/S patients. (CD3\*UICC: HR: 1.949;  $p=0.004$ ). Thereby, the prognostic potential of a high infiltration with CD3<sup>+</sup> TILs was limited to early stages of disease as long as TILs did not express PD-1.*

**Conclusions:** *High infiltration of tumor tissue with CD3<sup>+</sup> lymphocytes was associated with an increased survival of AGE/S patients. Subgroup analyses indicate that TIL*

*dependent anti-tumor immune response is only effective in gastric cancer patients in early stages of disease and become ineffective in later stages of disease due to an increased expression of the T cell exhaustion marker PD-1.*

Modifiziert nach (1)

### **Abstrakt Deutsch**

**Einleitung:** *Die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorgewebe sowie dessen prognostische Bedeutung gewinnt bei Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs und des Magens (AGÖ/M) zunehmend an Bedeutung. Diese Studie analysiert zum ersten Mal die prognostischen Auswirkungen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) und Checkpoint-Inhibitoren in einer großen kaukasischen Kohorte bei Patienten mit AGÖ/ M.*

**Methoden:** *Es wurden Gewebeproben von 438 neoadjuvant unbehandelten Patienten mit AGÖ/M, die zwischen 1992 und 2004 primär operativ therapiert wurden, in einem Tissue Micro Array (TMA) untersucht. TMAs wurden mit Antikörpern gegen menschliches CD3, CD4, CD8, PD-1 und PD-L1 angefärbt und die Häufigkeit von TILs pro 1 mm<sup>2</sup> Tumorgewebe bestimmt. Anschließend wurde das Ausmaß der Lymphozyteninfiltration mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert.*

**Ergebnisse:** *Eine hohe Infiltration mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> TILs) stellte sich als prognostischer Marker für ein erhöhtes Gesamtüberleben von AGÖ/M-Patienten im Vergleich zu Personen mit niedriger T-Zellzahl (CD3: 106.04 Monate vs. 64.38 Monate; p = 0.002; CD4: 116.92 Monate vs. 56.36 Monate; p <0,001; CD8: 101.53 Monate vs. 67.34 Monate; p = 0.016) dar. Eine hohe Infiltration mit CD3<sup>+</sup>- Lymphozyten war in der multivariaten Analyse mit einem erhöhten Überleben assoziiert (HR: 0.326; p = 0.023). Subgruppenanalysen ergaben,*

dass das Tumorstadium und der CD3<sup>+</sup> TIL-Zustand stark korrelierten und als prognostischer Marker für das klinische Outcome von AGÖ/M-Patienten dienen könnte. (CD3 \* UICC: HR: 1.949; p = 0.004). Dabei war das prognostische Potenzial einer hohen Infiltration mit CD3<sup>+</sup> TILs auf frühe Tumorstadien beschränkt und nur vorhanden, solange TILs kein PD-1 exprimierten.

**Schlussfolgerungen:** Eine hohe Infiltration von Tumorgewebe mit CD3<sup>+</sup> Lymphozyten war mit einem erhöhten Überleben von AGÖ/M- Patienten verbunden. Subgruppenanalysen zeigen, dass die TIL-abhängige Immunantwort gegen den Tumor nur bei Magenkrebspatienten in frühen Krankheitsstadien wirksam ist und in späteren Krankheitsstadien vermutlich aufgrund einer erhöhten Expression des T-Zell-Erschöpfungsmarkers PD-1 unwirksam wird.

Modifiziert nach (1)

### **3. Darstellung des Forschungsstandes**

Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs und des Magens (AGÖ/M) gelten weltweit als die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache (2). Es lässt sich jedoch ein Rückgang der Inzidenz von Magenkarzinomen beobachten, was hauptsächlich mit der verbesserten Diagnostik und Therapie eines der Hauptrisikofaktoren, der Helicobacter Pylori Infektion, im Zusammenhang zu stehen scheint (3). Die Inzidenz der Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs steigt hingegen, was vornehmlich mit der Zunahme von Adipositas und der damit assoziierten gastroösophagealen Reflux-Erkrankung (GERD) und dem Barrett-Ösophagus erklärt wird (4, 5).

Bis heute ist der einzige kurative Therapieansatz bei AGÖ/M die R0 Resektion mit erweiterter D2-Lymphadenektomie. Durch die oftmals späte Diagnostik bei fehlender Frühsymptomatik ist die Prognose bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 30% für Männer und 33% für Frauen weiterhin ungünstig (6).

Neben bekannten prognostischen Parametern, welche hier nur beispielhaft genannt werden sollen, wie Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Metastasierung, Grading oder Resektionsstatus, sind auch immunologische und genetische Parameter Gegenstand aktueller Forschung in verschiedenen Tumorentitäten (6, 7).

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist als molekulargenetischer Parameter von prognostischer Bedeutung. Diese ist ein Marker für Mutationen in den Gensequenzen der DNA-mismatch-Reparaturproteine (MMR). Sie tritt auf, wenn das körpereigene DNA-Reparatur-System es nicht mehr vermag, fehlerhaft eingebaute Basen in neu hergestellten DNA-Strängen zu detektieren (dMMR). Ist dieses System intakt, wird von einer Mikrosatellitenstabilität (MSS) gesprochen (8). Ihr wird ein Zusammenhang zu

klinischen Parametern wie einem verbesserten Überleben von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zugesprochen (8, 9). Bisherige Daten zeigen, dass das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität in dieser Entität zu einem verbesserten Ansprechen von immuntherapeutischen Modulatoren führt (10). Der gängige Erklärungsansatz hierzu spricht von einer erhöhten Mutationslast bei einem defizienten MMR-System, was zu einer verbesserten Erkennbarkeit des Tumors für eine Immuntherapie zu führen scheint (10, 11). Auch bei Patienten mit Magenkarzinomen konnte in einer Studie von Fang et al. ein positiv prognostischer Effekt bezüglich des Gesamtüberlebens mit einem defizienten MMR-System assoziiert werden (12).

Die prognostische Rolle des Immunsystems beziehungsweise immunologischer Parameter in sowohl der Tumorentstehung als auch der Tumorbekämpfung ist bislang nicht geklärt (13, 14).

Einerseits entsteht im Rahmen einer *Helicobacter pylori*- Infektion des Magens durch die Invasion von Immunzellen eine chronische Inflammation, welche maßgeblich an der Entstehung von Adenokarzinomen des Magens beteiligt ist, was einen negativen Einfluss suggeriert (15). Andererseits konnte in anderen Studien eine positive Wirkung auf die Prognose gezeigt werden, wenn tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnten (16-19).

Als Parameter für intratumorale immunogene Aktivität werden TILs im Magenkarzinom zunehmend untersucht. Eine Meta-Analyse von 2017 fasste einen Großteil der bisher erhobenen Daten zum prognostischen Einfluss von TILs aus 31 Studien zusammen. Dabei ließ sich ableiten, dass eine hohe Infiltration mit CD3 und CD8 positive Lymphozyten das Gesamtüberleben signifikant verbesserten, während dieser Effekt sich nicht für CD4 positive Lymphozyten darstellen ließ (20). Nur vier von diesen 31



Studien untersuchten dabei kaukasische Patienten, dabei lag die maximale Patientenzahl bei 103. Von diesen vier Studien bezogen sich zwei auf den Zusammenhang zwischen Mikrosatelliteninstabilität und TILs im Allgemeinen. Die verbleibenden zwei Studien konnten keinen positiv prognostischen Effekt von CD3 oder CD8 positiven Lymphozyten auf das Überleben in kaukasischen Patienten darstellen. Keine der Studien untersuchte den Einfluss von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (20).

Alle übrigen von den 31 einbezogenen Studien untersuchten Kohorten mit Patienten asiatischen Ursprungs. In einigen von diesen ließ sich ein positiv prognostischer Effekt von TILs darstellen (21).

Daraus lässt sich schließen, dass der Einfluss von TILs in kaukasischen Patienten bislang nicht ausreichend untersucht wurde.

Als weiterer molekularer Parameter werden aktuell der Checkpoint-Rezeptor PD-1 und sein Ligand PD-L1, welche an der Herunterregulierung der T-Lymphozyten beteiligt sind, untersucht (22, 23). PD-L1 ist physiologisch auf verschiedenen Körperzellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Muskelzellen oder Hepatozyten zu finden und wird auf soliden Tumoren wie auch auf hämatopoetischen neoplastischen Zellen überexprimiert (23). PD-1 hingegen findet sich vornehmlich auf T-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen (24). Die Interaktion von Rezeptor (PD-1) und Ligand (PD-L1) führt zu einer Verminderung der T-Zell-Aktivierung, welche dem Tumor zur Immunevasion verhilft (23). Um dies zu verhindern, wurden Checkpoint-Inhibitoren wie der PD-1 Inhibitor Pembrolizumab entwickelt, welche diese Checkpoint-Proteine blockieren. Diese Medikamente werden immer mehr zum Hoffnungsträger in mehreren Tumorentitäten in der aktuellen Tumorthherapie (25-28).

Hinsichtlich des prognostischen Effektes auf das Gesamtüberleben von Patienten wurden in verschiedenen Tumorentitäten verschiedene Effekte beobachtet. Während Darb-Esfahani et al. einen positiv prognostischen Effekt einer hohen Expression von PD-1 und PD-L1 sowohl in Tumorzellen als auch in Lymphozyten zeigen konnten, wurde durch Thompson et al. der gegenteilige Effekt dargestellt (29, 30). Zudem konnte von Böger et al. im Magenkarzinom in einer Kohorte kaukasischer Patienten ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben bei erhöhter PD-L1 Expression nachgewiesen werden (31). Der gleiche Einfluss einer PD-L1 Expression ließ sich auch von Wu et al. darstellen (32).

Als prognostischer Marker bezüglich der Effektivität der Checkpoint-Inhibitoren wird derzeit vornehmlich die PD-L1 Expression der Studienteilnehmer untersucht (28).

Auch die Interaktion zwischen TILs und der Checkpoint-Proteine PD-1 und PD-L1 sowie deren Einfluss auf das Ansprechen von Patienten auf Immuntherapie ist derzeit Gegenstand der Forschung (33). (1)

## **4. Vertiefte Schilderung der Methodik**

### **Patientenkollektiv**

Für diese Studie wurden klinische Daten von 438 Patienten mit AGÖ/M retrospektiv erhoben. Es handelte sich dabei um Patienten mit Tumoren aller UICC Stadien mit und ohne Fern- und Lymphknotenmetastasierung sowie venöser und lymphatischer Infiltration, die zwischen 1992 und 2004 in der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Buch, primär alleinig operativ behandelt wurden.

Das Gesamtüberleben wurde als Zeit von der Diagnose bis zum Tod oder dem letzten Follow-up definiert. Die Patientendaten und Follow-up-Informationen wurden aus der Patientenmanagementsoftware (SAP®) und dem regionalen Krebsregister („Gemeinsames Krebsregister“) extrahiert. (1)

### **Genehmigung und Datenschutz**

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité (EA4 / 115/10) genehmigt und entsprechend durchgeführt. Die „Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis“ und die Bestimmungen des Berliner Datenschutzgesetzes wurden eingehalten. (1)

### **Gewebeproben**

Für diese Studie konnten insgesamt 438 in Paraffin gebettete Tumorproben von Patienten, die ohne vorherige, neoadjuvante Therapie an der Charité operiert wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité gewonnen werden. Die Gewebeproben wurden im Anschluss von einem Pathologen mit besonderem Schwerpunkt auf gastrointestinaler Pathologie (Dr. Moritz von Winterfeld, Institut für Pathologie, Charité Berlin) im Hinblick auf Tumorgröße, Invasionstiefe und Tumordinvasion von Venen oder Lymphgefäßen morphologisch klassifiziert. Dabei

richtete sich das Augenmerk vor allem auf die postoperative histologische Diagnose, das Tumorstadium und auf das Grading. Zudem erfolgte eine erneute Einstufung unter Verwendung der Laurén- und Ming-Klassifikation. (1)

### **Tissuemicroarray und Immunhistochemie**

Die vorliegenden Gewebeproben wurden anschließend mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, um diese auf repräsentative Bereiche mit soliden Tumoranteilen zu untersuchen. Aus jeder der 438 verfügbaren Proben wurden jeweils zwei Gewebestanzungen („Cores“) mit einem Durchmesser von einem Millimeter gestanzt und auf einen Paraffinblock übertragen (= Tissuemicroarray, kurz TMA). Anschließend erfolgte das Einschmelzen des Paraffinblocks sowie das Anfertigen von jeweils vier-Mikrometer- dicken Schnitten aus jedem TMA-Block. Es wurde eine weitere Hämatoxylin- und Eosin-Färbung an den TMA-Schnitten durchgeführt, um erneut zwischen Tumor- und Nicht-Tumorgewebe differenzieren zu können.

Die 438 Proben wurden jeweils auf CD3, CD4 und CD8 mittels des „Immunohistochemistry Leica® BOND™“ System, einem vollautomatischen Färbesystem mit vorgegebenem Anfärbeprotokoll, angefärbt. Dabei wurden folgende monoklonale Maus-Antikörper verwendet, jeweils in einer 1:100-Konzentration: CD3 (Klon LN10) (Bestellnummer NCL-L-CD3-565, Novocastra®), CD8 (C8 / 144B, Bestellnummer M7103, DAKO®), CD4 (4B12, Bestellnummer CD4-368-LC, Novocastra®).

Die gleiche Technik wurde für die PD-1 bzw. PD-L1 Expression genutzt. Es wurden folgende Antikörper genutzt: PD-L1: (Anti-PD-L1-Antikörper Cell Signaling Technologies, Danvers, USA, Klon E1L3N, Konzentration 1: 200), PD-1: (PD-1-Antikörper Epitomics-Klon EP239 Burlingame, Kalifornien, Konzentration 1: 100).

Um die Mikrosatelliteninstabilität zu untersuchen wurde eine immunhistochemische Anfärbung mit einem weiteren automatisierten Färbesystem (BenchMark Ultra, Roche Ventana, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden folgende Antikörper verwendet: (alle Roche Ventana) MLH1 (Klon M1), PMS2 (Klon EPR3947), MSH2 (Klon G219-1129) und MSH6 (Klon 44).

Für die Analysen wurden nur TMAs berücksichtigt, die repräsentative Tumorschnitte enthielten (Abbildung 1,2). Alle TMAs wurden von M. Pötzsch und Dr. med. C. Treese ausgewertet, die für die klinischen Informationen der Patienten verblindet waren. Nach der Aufbereitung und Anfärbung wurden die TMAs in einem Haupt Gesichtsfeld (high power field) mit zwei Cores pro Gewebeprobe visualisiert und durch Auszählung ausgewertet. Der Durchschnitt der positiv angefärbten Zellen wurde pro Quadratmillimeter berechnet. Kontroverse Fälle mit abweichenden Ergebnissen wurden wechselseitig diskutiert, dies war in 62 Fällen für CD3, in 35 Fällen für CD4 und in 28 Fällen für CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nötig. Die Auswertung der PD-1 und PD-L1 Expression wurde von der Pathologin Prof. Dr. med. K. Jöhrens vorgenommen, dabei wurde zwischen Expression in Tumorzellen und Immunzellen unterschieden. (1)

### **Statistik**

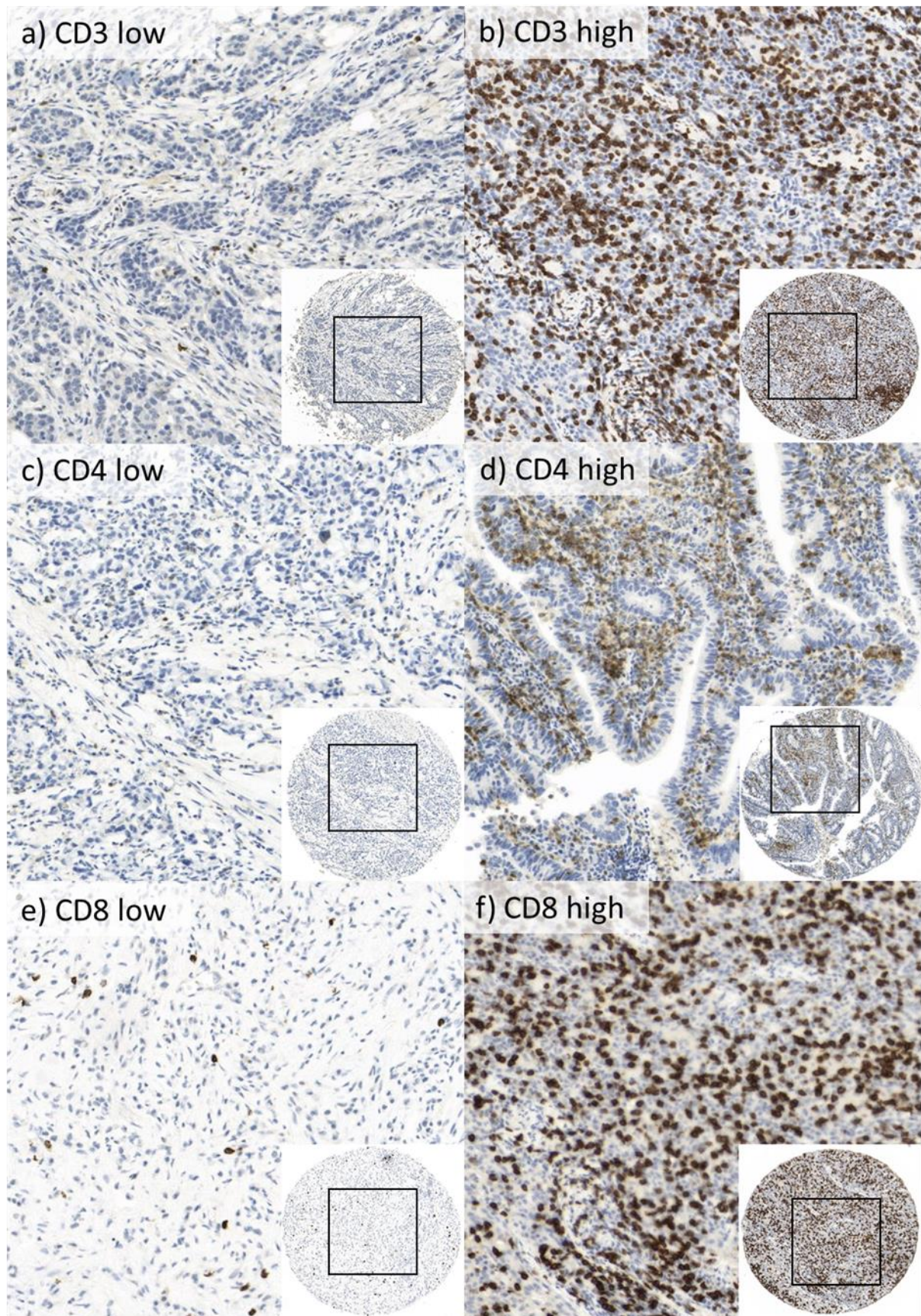
Die statistischen Analysen wurden mit der IBM SPSS-Software Version 24 durchgeführt. TILs wurden in „hoch“ und „niedrig“ gruppiert, wobei der Median und nicht der Mittelwert als Cutoff-Wert verwendet wurde, da die Zellzahlen nicht normalverteilt vorlagen. Zur Gruppierung von PD-1 und PD-L1 wurde eine Expression von über bzw. unter 1% als Cutoff verwendet. Quantitative Werte wurden mit mittlerer Standardabweichung, Median oder als Bereich und kategoriale Werte mit absoluten und relativen Häufigkeiten (Anzahl und Prozent) ausgedrückt. Das Gesamtüberleben wurde mittels Überlebenszeitanalyse als Kaplan-Meier-Kurve ausgewertet. Die

Korrelationen von CD3<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>- Dichte und Tumorgröße, Fern- und Lymphknotenmetastasierung, venöse und lymphatische Infiltration, Laurén- und Ming-Klassifikation, Grading und UICC-Klassifikation wurden mittels Chi-Quadrat-Tests analysiert. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurden univariate Überlebensanalysen nach der Kaplan-Meier-Methode unter Verwendung des Log-Rank-Tests durchgeführt. Für multivariate Analysen wurde ein Cox-Regressions-Modell in einer schrittweisen Vorwärts- / Rückwärtsanalyse erstellt, dabei wurde ein p-Wert von <0.05 als signifikant gewertet. In Absprache mit einer Statistikerin der Charité (Andrea Stroux) wurden zudem Wechselwirkungsanalysen durchgeführt, um etwaige (statistische) Interaktionen zwischen verschiedenen analysierten Parametern aufzudecken. Aufgrund einer hohen Korrelation zwischen CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TILs wurde jeder dieser Immunmarker in eigenständigen Cox-Regressions-Modellen analysiert.

Bei der Durchführung von multivariaten Analysen mussten Referenzkategorien für die einzelnen Parameter festgesetzt werden. Als Referenzkategorie für den TIL- Status wurde eine niedrige CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>- Lymphozyteninfiltration festgesetzt. Für Wechselwirkungsanalysen zwischen der CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup> - und CD8<sup>+</sup>- Lymphozyteninfiltration und dem UICC-Stadium wurde eine niedrige Infiltration und das UICC-Stadium I und II als Referenzkategorie verwendet (detaillierte Referenzkategorien siehe Tabellenbeschreibungen).

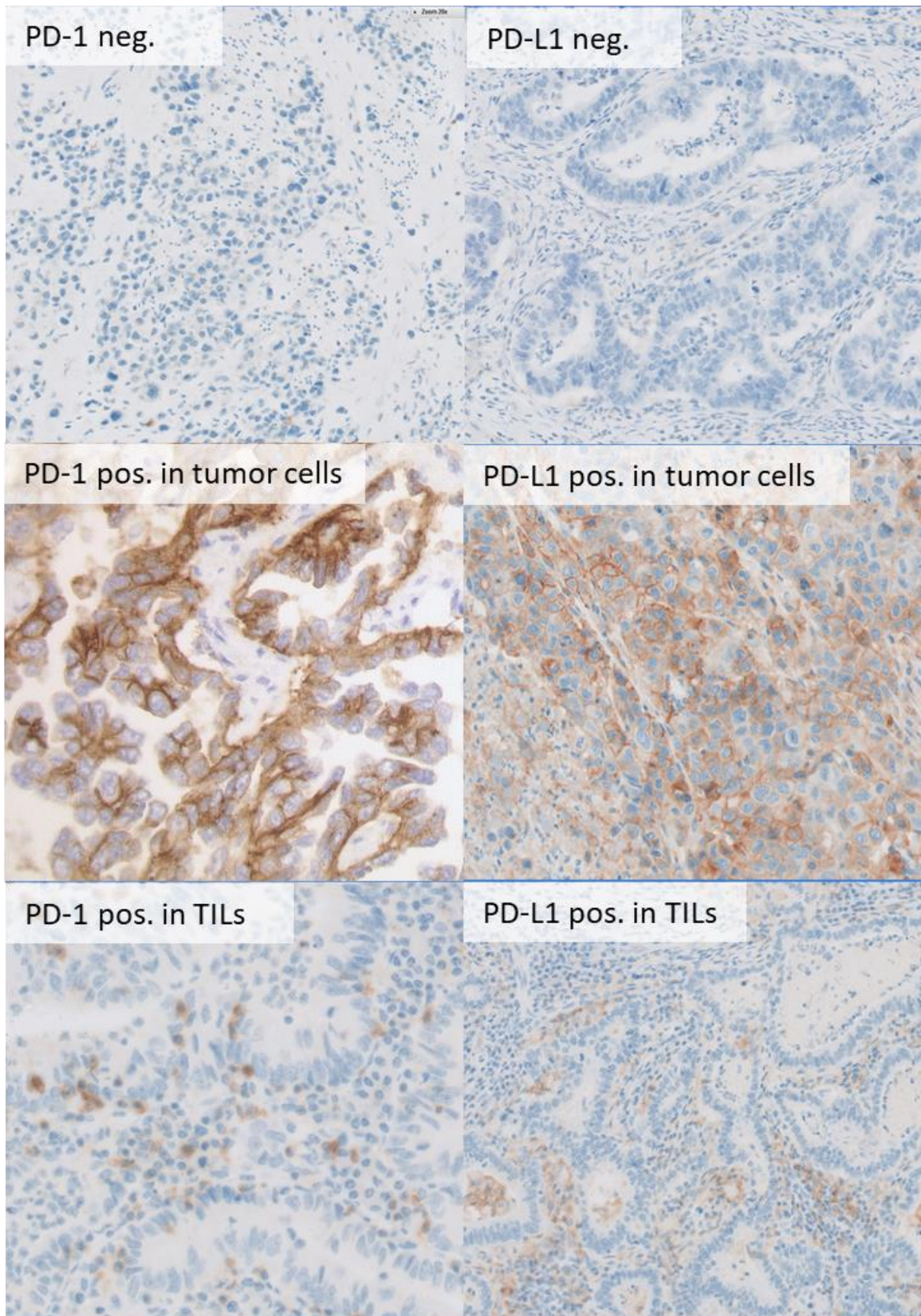
Die Empfehlungen für prognostische Tumormarker-Studien (REMARK) wurden für diese Studie angewendet, sofern durchführbar (34). (1)





**Abbildung 1: Immunohistologische Anfärbung auf CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten in 400facher Vergrößerung. Die Tumorproben wurden jeweils in einen hohen bzw. niedrigen CD3, CD4 oder CD8 positiven Infiltrationsstatus mittels Medians gruppiert. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1).**





**Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung auf PD-1 and PD-L1 Expression in Tumorzellen und TILs in 400facher(b,d,e) and 20facher (a,c,f) Vergrößerung. Die Tumorproben wurden in negativ und positiv mit einem Cutoff von über >1% Expression eingeteilt. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1).**



## **5. Wesentliche neue Ergebnisse**

### **Klinische Merkmale**

Insgesamt konnten 438 Patienten retrospektiv in die Studie eingeschlossen werden (weiblich = 178, Durchschnittsalter = 62 Jahre) (95% CI: 60.97-63.15 Jahre). Diese waren über alle Tumorstadien verteilt (UICC I = 162; UICC II = 111; UICC III = 50; UICC IV = 115 Patienten). Daten zur lymphatischen Infiltration lagen in 363 Fällen vor und 213 davon zeigten einen L1-Status (48,7%). Informationen zur venösen Infiltration lagen in 353 Fällen vor, 120 Patienten wurden als V1-Status eingestuft (27,4%).

Bezüglich des Resektionsrandes wurden 300 Fälle als R0, 22 als R1 und einer als R2 kategorisiert. In 115 Fällen wurde eine palliative Tumorsektion durchgeführt. Für diese Palliativfälle musste eine Zensur mittels multivariater Confounder-Analyse durchgeführt werden, da der operative Eingriff nicht kurativ durchgeführt wurde und somit die Ergebnisse verfälscht hätte.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 121,7 Monate (95% CI: 113,9 - 129,5 Monate) und 291 Patienten (66,4%) starben während dieser Zeit, 225 (51,4%) davon tumorassoziiert. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben betrug 38,1%, das 5-Jahres-tumorassoziierte Überleben 45,4%. Alle Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 zusammengefasst. (1)

### **Morphologische Eigenschaften**

Die Tumorklassifikation und der morphologische Status der Tumorproben wurden anhand dem Grading und der Laurén- und Ming-Klassifikation bewertet. Tumorgrading: G1 bei 8 (1,8%), G2 bei 116 (26,5%) und G3 bei 311 Patienten (71,0%), drei waren nicht klassifiziert (0,7%). Die Tumorklassifikation nach Laurén war bei 176 (40,2%) vom intestinalen Typ, bei 201 (45,9%) vom diffusen Typ und bei 58 Patienten

(13,2%) vom gemischten Typ, drei Fälle waren nicht klassifiziert (0,7%). Die Tumorklassifikation nach Ming war bei 172 (39,3%) expansiv, bei 259 (59,1%) infiltrativ und bei sieben Patienten (1,6%) nicht klassifiziert. (1)

### **Lokalisation**

Die Tumore wurden zu 84,9% (n = 372) im Magen und zu 15,1% am gastroösophagealen Übergang (n = 66) lokalisiert. Die Verteilung über die Tumorstadien stellte sich als gleichmäßig dar (AGÖ: UICC I/ II: 24,9% und III/ V: 22,9%;  $p = 0,107$ ). Die Lokalisation hatte keinen Einfluss auf das mittlere Gesamtüberleben (AGÖ: 80,1 vs. Magen 84,0 Monate;  $p = 0,799$ ). Zudem fand sich eine signifikante Assoziation von CD3<sup>+</sup> TILs und Gesamtüberleben lediglich in Adenokarzinomen des Magens (AGÖ: CD3 niedrig: 74,1 vs. hoch: 109,1 Monate ( $p = 0,276$ ); Magen: CD3 niedrig: 63,3 vs. hoch: 104,7 Monate ( $p = 0,004$ )). Der negative prognostische Effekt der PD-1-Expression in TILs konnte ebenfalls nur in der Patientensubgruppe mit Magentumoren gezeigt werden (AEG: PD-1 in TIL negativ: 65,5 vs. positiv: 70,0 Monate ( $p = 0,636$ ); Magen: PD-1 in TIL negativ: 98,9 vs. positiv: 54,3 Monate ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 4e)). (1)

### **MMR-Status**

Nach der immunhistochemischen Anfärbung auf MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 zeigten 45 Patienten (10,3%) ein defizientes DNA mismatch-repair (dMMR) System, während 338 (77,2%) ein intaktes DNA mismatch-repair hatten (pMMR), bei 55 Patienten (12,6%) war der MSI-Status nicht auswertbar. Das mittlere Gesamtüberleben betrug 47,22 Monate bei dMMR Patienten und 79,78 Monate bei pMMR Patienten ( $p = 0,025$ ). In dieser AGÖ/M - Kohorte wurden MSI-Patienten in höheren Tumorstadien diagnostiziert als Patienten ohne mismatch-repair Defizienz

((dMMR: T1/ T2: 40% T3/ T4: 60% vs. pMMR: T1/ T2: 62%, T3/ T4: 38%) ( $p = 0,032$ )).

Tumorstadien-assoziierte Gesamtüberlebensanalysen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Überleben von dMMR und pMMR-Patienten. (1)

### **CD3-, CD4- und CD8-Expression**

Um den prognostischen Wert von TILs zu bestimmen, wurde die Expression von CD3, CD4 und CD8 in TILs im Tumorgewebe, jedoch nicht im nicht-neoplastischen Magen- und Ösophagusepithel analysiert. Von 438 Proben waren 343 CD3-, 335 CD4- und 344 CD8-gefärbte Proben für die Analyse auswertbar. Beispiele der analysierten immunhistochemischen Färbung sind in Abbildung 1 gezeigt.

Die durchschnittliche Anzahl von TILs / mm<sup>2</sup> war wie folgt: CD3<sup>+</sup>-TIL-Infiltration: niedrig: 122 vs. hoch: 513; CD4<sup>+</sup>-TIL-Infiltration: niedrig: 30 vs. hoch: 251; CD8<sup>+</sup>-TIL-Infiltration: niedrig: 74 vs. hoch: 360. Die CD3<sup>+</sup>- Lymphozyteninfiltration korrelierte signifikant mit der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Infiltration (jeweils  $p < 0.001$ ).

Patienten mit einer hohen CD3<sup>+</sup>- Lymphozyteninfiltration zeigten ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen Infiltration (CD3: 106.04 Monate vs. 64.38 Monate;  $p = 0.002$ ). Der gleiche Effekt konnte für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TILs festgestellt werden (CD4: 116.91 Monate vs. 56.36 Monate;  $p < 0.001$ ; CD8: 101.53 Monate vs. 67.34 Monate;  $p = 0.016$ ) (siehe Abbildung 4a).

In den durchgeführten Subgruppenanalysen zeigte sich, dass die positiven prognostischen Effekte der TIL-Infiltration auf das UICC-Stadium I beschränkt waren. In höheren Tumorstadien waren diese Effekte nicht mehr nachweisbar oder sogar umgekehrt (UICC-Stadium III) (siehe Tabelle 2, Abbildung 4c).

Um Störfaktoren sowie Wechselwirkungen innerhalb der Parameter zu erkennen, wurde sowohl eine multivariate als auch eine Wechselwirkungsanalyse mit allen

Parametern durchgeführt, die sich in der univariaten Analyse als statistisch signifikant herausstellten. Aufgrund der hohen Korrelation der CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyteninfiltration wurden diese Parameter jeweils in separaten Cox-Regressionsmodellen analysiert. Die Analyse zeigte, dass ein Zustand hoher CD3-Infiltration (CD3: HR: 0.326; p = 0.023) sowie die Wechselwirkung zwischen CD3<sup>+</sup> - Infiltrationszustand und UICC-Stadium unabhängige, prognostische Faktoren sind (CD3 \* UICC: HR: 1.949; p = 0.004). Die entsprechenden Cox-Regressionsmodelle für eine hohe CD4- und CD8-Infiltration zeigten keine Signifikanz für CD4<sup>+</sup> - oder CD8<sup>+</sup> - Zellen oder eine signifikante Wechselwirkung mit dem Tumorstadium nach UICC (CD8: HR: 0,748; p = 0,570; CD4: 0,391; p = 0,065; CD8 \* UICC: HR: 1,113; p = 0,659). Die Wechselwirkung zwischen CD4<sup>+</sup> -Lymphozyten und dem UICC-Stadium erreichte nur in der Rückwärtsanalyse, nicht aber in der Vorwärtsanalyse statistische Signifikanz (CD4 \* UICC: HR: 1.607; p = 0.044). In der statistischen Vorwärtsanalyse werden sukzessiv alle unabhängigen, signifikanten Faktoren in das Modell einbezogen, während in der Rückwärtsanalyse sukzessiv alle ausgewählten Faktoren herausgerechnet werden. Daher kann es vorkommen, dass auch andere Faktoren durch diese Analyse im Modell bestehen bleiben. Dementsprechend ist statistisch die Vorwärtsanalyse als die genauere Analyse zu betrachten, während die Rückwärtsanalyse eher als Kontrollfunktion der Vorwärtsanalyse zu sehen ist. Alle Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analyse sind in den Tabellen 3, 4 und 5 dargestellt. (1)

### **PD-L1- und PD-1-Expression**

Die PD-L1- und PD-1-Expression wurde in Tumorzellen und in TILs analysiert. In 328 Fällen (74,9%) konnte die Färbung bewertet werden. Abhängig von der Anwesenheit

oder Abwesenheit von PD-L1 und PD-1 wurden die Befunde in Lymphozyten und Tumorzellen in zwei Gruppen unterteilt: PD-L1 und PD-1 positiv und negativ.

### **PD-1**

In dieser Studie konnte bei Tumoren von Patienten ohne PD-1-Expression in TILs ein signifikant erhöhtes mittleres Gesamtüberleben gezeigt werden: PD-1 negativ: 95.07 Monate vs. positiv: 56.51 Monate;  $p = 0,001$  (Abbildung 4b). Die PD-1-Expression korrelierte stark mit der Infiltration von CD3<sup>+</sup> TILs. PD-1-positive TILs waren in 39.0% ( $n = 60$ ) der Tumoren mit niedriger CD3<sup>+</sup>-Lymphozyteninfiltration und in 63.9% ( $n = 92$ ) mit hoher Infiltration ( $p < 0.001$ ) nachweisbar. Die oben beschriebene protektive Wirkung einer hohen CD3-Lymphozyteninfiltration war zwar bei Patienten mit PD-1-Expression in TILs nicht nachweisbar, war keine PD-1-Expression vorhanden, trat dieser Effekt jedoch wieder auf (PD-1 positiv: CD3 hoch vs. niedrig: 53.7 vs. 59.8 Monate;  $p = 0.714$ ; PD-1 negativ: CD3 hoch vs. niedrig: 132.6 vs. 65.9 Monate;  $p = 0.001$ ) (Abbildung 4d). Die PD-1-Expression in TILs war über die UICC-Tumorstadien hinweg größtenteils gleichmäßig verteilt (UICC I: 41.1%, UICC II 47.3%, UICC III 64.4%, UICC IV 51.2%;  $p = 0.066$ ).

Eine Expression des Checkpoint-Proteins PD-1 in Tumorzellen konnte nur in Gewebeproben im UICC I Stadium nachgewiesen werden (Abbildung 3). Hohe signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen PD-1-positiven und -negativen Tumoren wurden daher ehestens durch diese unausgeglichene Verteilung über die Tumorstadien hinweg verursacht: PD-1: negativ: 58.96 Monate vs. positiv: 175.79 Monate;  $p = < 0,001$ ). Auch in dieser Kohorte wiesen Patienten in frühen Tumorstadien ein verbessertes Gesamtüberleben auf. Die positive prognostische Wirkung von CD3 wurde durch die PD-L1-Expression in Tumorzellen nicht beeinflusst.

Aufgrund der starken Korrelation zu UICC-Stadien wurde die PD-1-Expression in Tumorzellen von den multivariaten Analysen ausgeschlossen.

### **PD-L1**

Die Expression von PD-L1 in TILs zeigte keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben ( $p=0.428$ ). Die PD-L1-Expression in Tumorzellen war mit einem signifikant höheren Gesamtüberleben verbunden: 119.56 Monate vs. 68.23 Monate;  $p=0.003$ . In 6.3% ( $n=10$ ) der Tumoren mit niedriger CD3+-Lymphozyteninfiltration konnten PD-L1 positive Tumorzellen nachgewiesen werden, in 17.2% ( $n=25$ ) bei hoher Infiltration ( $p<0.003$ ). Dabei ließ sich keine Assoziation der prognostischen Wirkung von CD3 mit der PD-L1-Expression in Tumorzellen feststellen. Allerdings war die Anzahl der PD-L1-positiven Tumorzellen im UICC I-Stadium signifikant erhöht (UICC I: 25.7%, UICC II: 6.3%, UICC III 6.5%, UICC IV 4.8%;  $p<0,0001$ ). Die PD-L1-Expression in Tumorzellen hatte in der stadienabhängigen Subgruppenanalyse in keinem UICC-Stadium einen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Alle Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analyse sind in den Tabellen 3,4 und 5 dargestellt. (1)

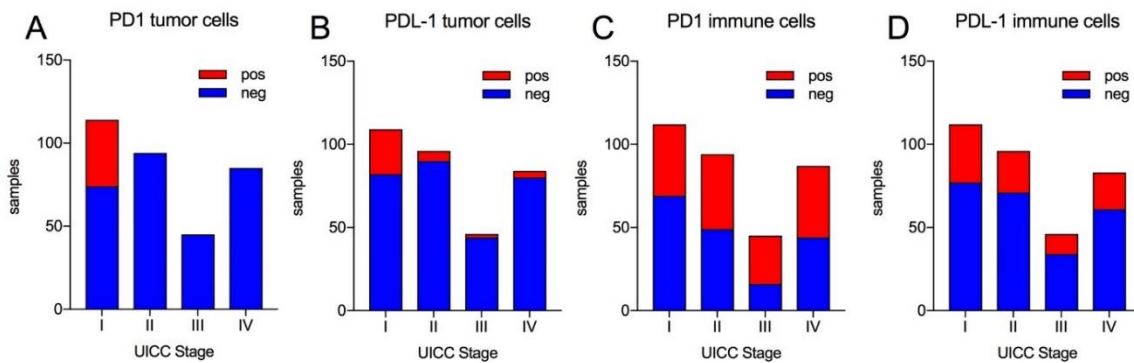
## Wesentliche neue Ergebnisse

Demographic	No. of Patients (N = 438)	%
<b>Age</b>		
≤ 62 years	214	48.9
> 62 years	224	51.1
<b>Sex</b>		
Female	178	40.6
Male	260	59.4
<b>Localization</b>		
AEG	66	15.1
Gastric	372	84.9
<b>UICC</b>		
pI	162	37.0
pII	111	25.3
pIII	50	11.4
pIV	115	26.3
<b>R</b>		
R0	300	68.6
R1	22	5.0
R2	1	0.2
Palliative	115	26.3
<b>Lymphatic Infiltration</b>		
L0	150	34.2
L1	213	48.6
Unknown	75	17.2
<b>Venous Infiltration</b>		
V0	233	53.2
V1	120	27.4
Unknown	85	19.4
<b>Lauren</b>		
Intestinal	176	40.2
Diffuse	201	45.9
Mixed	58	13.2
Unknown	3	0.7
<b>Ming</b>		
Expansive	172	39.3
Infiltrative	259	59.1
Unknown	7	1.6
<b>Grading</b>		
G1	8	1.8
G2	116	26.5
G3	311	71.0
Unknown	3	0.7
<b>MMR</b>		
dMMR	45	10.3
pMMR	338	77.2
Unknown	55	12.6

**Tabelle 1: Patientencharakteristika.** Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1), Supplement.

	TIL high		TIL low		p
	OS (Month)	OS (Month)	OS (Month)	OS (Month)	
<b>CD3</b>					
<b>UICC I</b>	<b>176.54</b>	<b>108.17</b>	<b>108.17</b>	<b>108.17</b>	<b>0.001</b>
UICC II	57.77	79.86	79.86	79.86	0.341
<b>UICC III</b>	<b>16.88</b>	<b>43.24</b>	<b>43.24</b>	<b>43.24</b>	<b>0.008</b>
UICC IV	8.05	11.94	11.94	11.94	0.221
<b>All</b>	<b>106.04</b>	<b>64.38</b>	<b>64.38</b>	<b>64.38</b>	<b>0.002</b>
<b>CD4</b>					
<b>UICC I</b>	<b>170.72</b>	<b>116.83</b>	<b>116.83</b>	<b>116.83</b>	<b>0.022</b>
UICC II	59.14	64.76	64.76	64.76	0.306
<b>UICC III</b>	<b>16.82</b>	<b>36.44</b>	<b>36.44</b>	<b>36.44</b>	<b>0.038</b>
UICC IV	8.05	11.94	11.94	11.94	0.221
<b>All</b>	<b>116.91</b>	<b>56.36</b>	<b>56.36</b>	<b>56.36</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>CD8</b>					
<b>UICC I</b>	<b>168.74</b>	<b>118.41</b>	<b>118.41</b>	<b>118.41</b>	<b>0.042</b>
UICC II	60.12	78.55	78.55	78.55	0.508
UICC III	26.0	28.15	28.15	28.15	0.644
UICC IV	9.9	11.33	11.33	11.33	0.789
<b>All</b>	<b>101.53</b>	<b>67.34</b>	<b>67.34</b>	<b>67.34</b>	<b>0.016</b>

**Tabelle 2: Subgruppenanalyse: Gesamtüberleben in Monaten im Zusammenhang zwischen TIL Infiltration und dem UICC Stadium.** Tumorproben wurden in niedrige oder hohe Infiltration mit CD3+, CD4+ oder CD8+ TILs mittels Medians unterteilt. Unterschiede im Gesamtüberleben wurden durch die Kaplan-Meier-Methode mittels Log-rank-Test dargestellt. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1).



**Abbildung 3: PD-L1 und PD-1 Expression in verschiedenen UICC Stadien** (blau= negative Expression, rot= positive Expression); A: PD-1 in Tumorzellen, B: PD-L1 in Tumorzellen, C: PD-1 in Immunezellen, D: PD-L1 in Immunezellen. Quelle: Selbst erstellte Grafik durch M. Pötzsch.

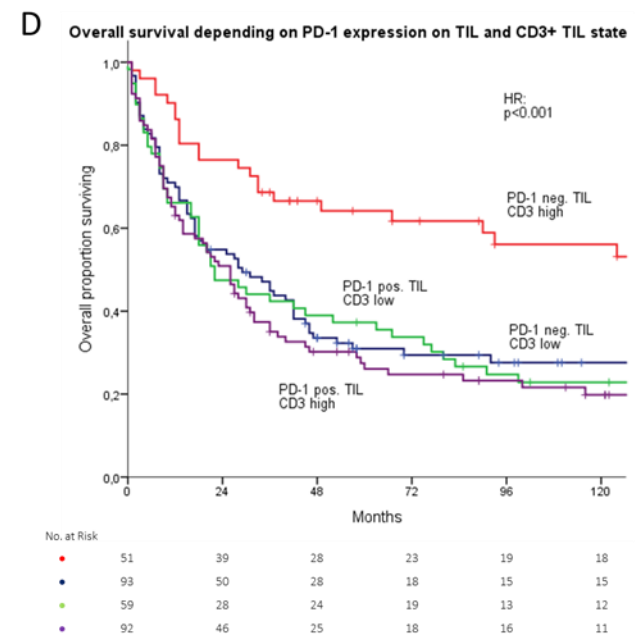
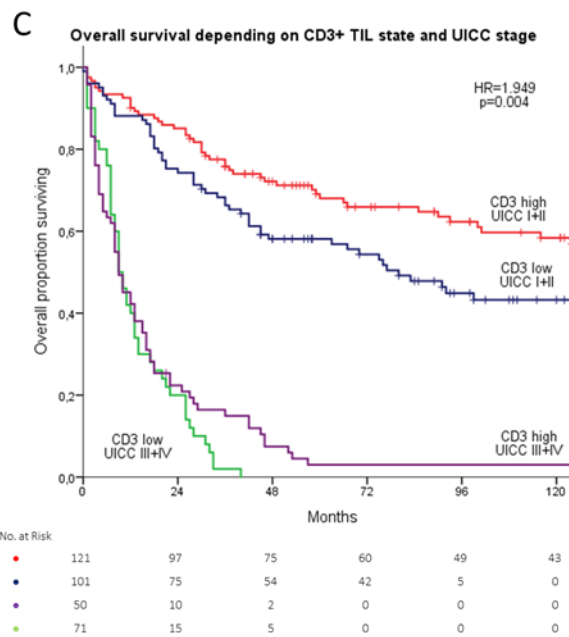
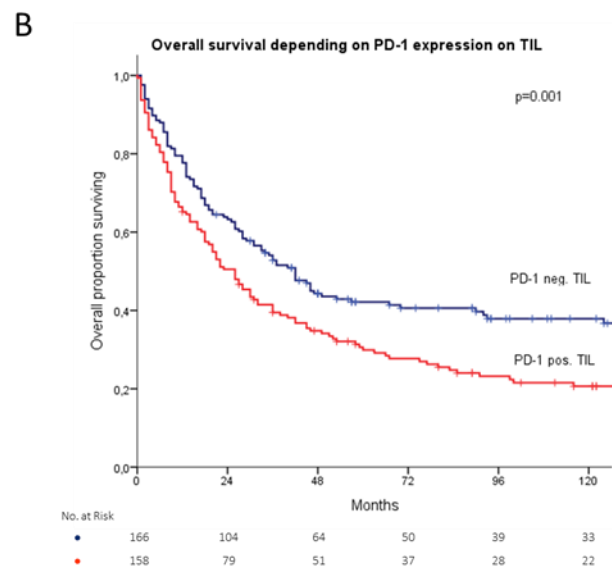
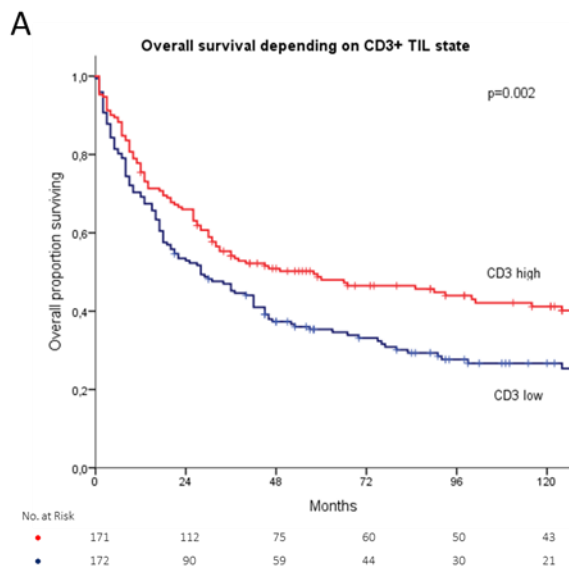


## Wesentliche neue Ergebnisse

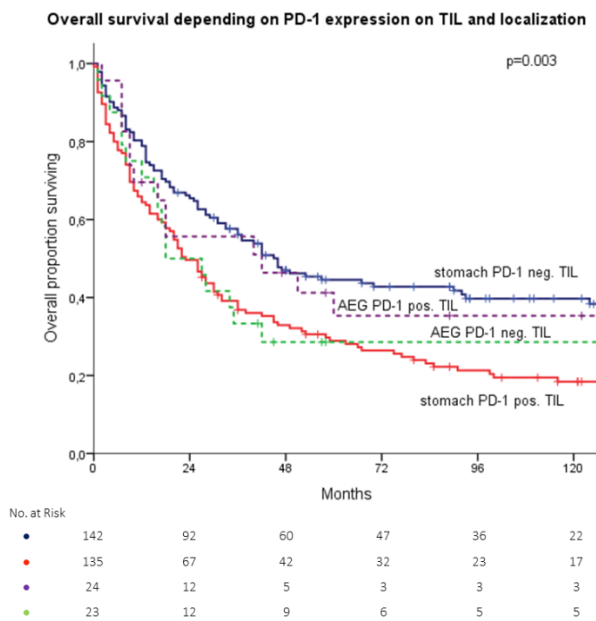
Clinical Factor	Univariate			Multiple Cox Regression (after forward/[backward] selection)		
	Mean Survival	CI	p	HR	CI	p
Total patients	83.78	74.7-92.86				
Age						
≤ 62 years	97.85	84.97-110.72	<0.001	1.027	1.009-1.046	0.004
> 62 years	65.86	54.51-77.2		<b>1.025†</b>	<b>1.007-1.043</b>	<b>0.006</b>
Sex						
Female	96.82	81.88-111.76	<0.005	0.790	0.540-1.154	0.222
Male	72.92	62.09-83.75				
UICC stage						
UICC I	154.83	140.48-169.18	<0.001	2.484	1.964-3.142	<0.001
UICC II	70.16	56.53-83.79		<b>2.339†</b>	<b>1.839-2.976</b>	<b>&lt;0.001</b>
UICC III	26.65	16.61-36.68				
UICC IV	10.97	8.93-12				
R						
R0	116.82	105.42-128.22	<0.001	2.399	1.318-4.369	0.004
R1	23.91	8.53-39.28		<b>2.394†</b>	<b>1.329-4.313</b>	<b>0.004</b>
R2	7.0	7.0-7.0				
Lauren						
Intestinal	95.96	82.01-109.91	0.002	1.182	0.913-1.530	0.205
Diffuse	69.83	56.78-82.86				
Mixed	69.34	51.39-87.4				
MSI						
Positive	47.22	28.16-66.28	0.025	0.953	0.552-1.646	0.864
Negative	79.78	70.15-89.39				
CD3						
High	106.04	90.73-121.34	0.002	0.315	0.109-0.908	0.032
Low	64.38	53.43-75.32		<b>[0.326†</b>	<b>0.124-0.858</b>	<b>0.023]</b>
CD8						
High	101.53	86.49-116.56	0.016			
Low	67.34	55.8-78.97				
CD4						
High	116.92	101.16-132.67	<0.001			
Low	56.36	78.95-100.08				
PD-L1						
- Immune Cells						
Positive	63.03	49.19-76.86	0.428			
Negative	83.25	71.29-95.21				
- Tumor Cells						
Positive	119.56	90.57-148.56	0.003	0.848	0.474-1.519	0.580
Negative	68.23	59.05-77.53				
PD-1						
- Immune Cells						
Positive	56.51	45.99-67.02	0.001	0.925	0.552-1.552	0.768
Negative	95.07	80.32-109.82				
- Tumor Cells						
Positive	175.79	152.29-199.28	<0.001			
Negative	58.96	50.78-67.13				
UICC*CD3						
				1.683	1.039-2.725	0.034
				<b>[1.949†</b>	<b>1.242-3.059</b>	<b>0.004]</b>
PD-1*CD3						
				1.556	0.690-3.508	0.286
				<b>1.522†</b>	<b>1.065-2.174</b>	<b>0.021</b>

**Tabelle 3: Univariate und multivariate Überlebensanalysen einschließlich CD3, CD4, CD8-positive Lymphozyteninfiltration und PD-1 und PD-L1 Expression.**

CI: Konfidenzintervall; HR: Hazard Ratio. TILs wurden durch einen medianen Cutoff in hoch oder niedrig gruppiert. Das mittlere Überleben wird in Monaten des Überlebens angegeben. Alle für die univariate Analyse signifikanten Faktoren wurden in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell analysiert. Die Referenzkategorien für die multivariate Analyse sind „niedrige Infiltration“ für CD3, CD4 und CD8, „niedrige CD3-Infiltration und UICC I + II“ für die Wechselwirkung zwischen CD3- und UICC-Stadium, „niedrige CD3-Infiltration und PD-1 Expression negativ“ für die Wechselwirkung zwischen PD-1 Expression und CD3, „Patientenalter <62 Jahre“ für Alter, „männlich“ für Geschlecht, „positiv“ für den MSI-Zustand, „UICC I“ für das UICC-Stadium, „R0“ für R, „negativ“ für PD-1 und PD-L1 und „intestinaler Typ“ für die Laurén-Klassifikation. Die Infiltration von CD8 und CD4\* TIL sowie die Infiltration von PD-1 in Tumorzellen wurden aufgrund der hohen statistischen Korrelation von der multivariaten Analyse ausgeschlossen. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1).



E



**Abbildung 4:** a) Gesamtüberleben in Abhängigkeit von hohem CD3-positiven Lymphozytengehalt. b) Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der PD-1 Expression in Tumor infiltrierenden Lymphozyten. c) Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CD3-positiven Lymphozyten und dem UICC-Stadium. d) Gesamtüberleben in Abhängigkeit von PD-1 Expression in Tumor infiltrierenden Lymphozyten und CD3-positiven Lymphozyten e) Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der PD-1-Expression in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und der Tumorlokalisation. Tumorproben wurden unter Verwendung des Medians auf niedrige versus hohe Infiltration mit CD3-positiven TILs gruppiert. Für die Gruppierung in PD-1 und PD-L1 positiv / negativ wurde ein Ausdruck  $\geq 1\%$  als Cutoff verwendet. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1).

## Wesentliche neue Ergebnisse

Clinical Factor	Univariate			Multiple Cox Regression (after forward/[backward] selection)		
	Mean Survival	CI	p	HR	CI	p
Total patients	83.78	74.7-92.86				
Age						
≤ 62 years	97.85	84.97-110.72	<0.001	1.027	1.009-1.046	0.004
> 62 years	65.86	54.51-77.2		<b>1.028†</b>	<b>1.010-1.046</b>	<b>0.002</b>
Sex						
Female	96.82	81.88-111.76	<0.005	0.765	0.522-1.123	0.172
Male	72.92	62.09-83.75				
UICC stage						
UICC I	154.83	140.48-169.18	<0.001	2.096	1.456-3.017	<0.001
UICC II	70.16	56.53-83.79		<b>2.323†</b>	<b>1.820-2.966</b>	<b>&lt;0.001</b>
UICC III	26.65	16.61-36.68				
UICC IV	10.97	8.93-12				
R						
R0	116.82	105.42-128.22	<0.001	2.465	1.338-4.539	0.004
R1	23.91	8.53-39.28		<b>2.428†</b>	<b>1.349-4.369</b>	<b>0.003</b>
R2	7.0	7.0-7.0				
Lauren						
Intestinal	95.96	82.01-109.91	0.002	1.268	0.981-1.637	0.070
Diffuse	69.83	56.78-82.86		<b>1.288†</b>	<b>1.005-1.650</b>	<b>0.046</b>
Mixed	69.34	51.39-87.4				
MMR						
dMMR	47.22	28.16-66.28	0.025	0.983	0.572-1.691	0.951
pMMR	79.78	70.15-89.39				
CD3						
High	106.04	90.73-121.34	0.002			
Low	64.38	53.43-75.32				
CD8						
High	101.53	86.49-116.56	0.016	0.694	0.240-2.010	0.501
Low	67.34	55.8-78.97				
CD4						
High	116.92	101.16-132.67	<0.001			
Low	56.36	78.95-100.08				
PD-L1						
- Immune Cells						
Positive	63.03	49.19-76.86	0.428			
Negative	83.25	71.29-95.21				
- Tumor Cells						
Positive	119.56	90.57-148.56	0.003	0.840	0.464-1.518	0.563
Negative	68.23	59.05-77.53				
PD-1						
- Immune Cells						
Positive	56.51	45.99-67.02	0.001	1.171	0.701-1.957	0.547
Negative	95.07	80.32-109.82				
- Tumor Cells						
Positive	175.79	152.29-199.28	<0.001			
Negative	58.96	50.78-67.13				
UICC*CD8				1.116	0.691-1.802	0.655
PD-1*CD8				1.191	0.546-2.597	0.660

### **Tabelle 4: Univariate und multivariate Überlebensanalyse einschließlich CD8 und PD-1 und PD-L1.**

CI: Konfidenzintervall; HR: Hazard Ratio. TILs wurden durch einen medianen Cutoff in hoch oder niedrig gruppiert. Das mittlere Überleben wird in Monaten des Überlebens angegeben. Alle für die univariate Analyse signifikanten Faktoren wurden in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell analysiert. Die Referenzkategorien für die multivariate Analyse sind „niedrige Infiltration“ für CD3, CD4 und CD8, „niedrige CD8-Infiltration und UICC I + II“ für die Wechselwirkung zwischen CD8-Infiltration und UICC-Stadium, „niedrige CD8-Infiltration und PD-1 Expression negativ“ für die Wechselwirkung zwischen PD-1 Expression und CD8, „Patientenalter <62 Jahre“ für Alter, „männlich“ für Geschlecht, „positiv“ für den MSI-Zustand, „UICC I“ für das UICC-Stadium, „R0“ für R, „negativ“ für PD-1 und PD-L1 und „intestinaler Typ“ für die Laurén-Klassifikation. Die Infiltration von CD3 und CD4<sup>+</sup> TIL sowie die Infiltration von PD-1 in Tumorzellen wurden aufgrund der hohen statistischen Korrelation von der multivariaten Analyse ausgeschlossen. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1), Supplement.

## Wesentliche neue Ergebnisse

Clinical Factor	Univariate			Multiple Cox Regression (after forward/[backward] selection)		
	Mean Survival	CI	p	HR	CI	p
Total patients	83.78	74.7-92.86				
Age						
≤ 62 years	97.85	84.97-110.72	<0.001	1.026	1.008-1.045	0.006
> 62 years	65.86	54.51-77.2		<b>1.028‡</b>	<b>1.010-1.046</b>	<b>0.002</b>
Sex						
Female	96.82	81.88-111.76	<0.005	0.769	0.522-1.133	0.183
Male	72.92	62.09-83.75				
UICC stage						
UICC I	154.83	140.48-169.18	<0.001	1.973	1.437-2.708	<0.001
UICC II	70.16	56.53-83.79		<b>2.378‡</b>	<b>1.869-3.026</b>	<b>&lt;0.001</b>
UICC III	26.65	16.61-36.68				
UICC IV	10.97	8.93-12				
R						
R0	116.82	105.42-128.22	<0.001	2.374	1.302-4.327	0.005
R1	23.91	8.53-39.28		<b>2.335‡</b>	<b>1.301-4.194</b>	<b>0.005</b>
R2	7.0	7.0-7.0				
Lauren						
Intestinal	95.96	82.01-109.91	0.002	1.286	0.988-1.674	0.062
Diffuse	69.83	56.78-82.86		<b>1.329‡</b>	<b>1.029-1.717</b>	<b>0.029</b>
Mixed	69.34	51.39-87.4				
MSI						
Positive	47.22	28.16-66.28	0.025	1.077	0.601-1.932	0.803
Negative	79.78	70.15-89.39				
CD3						
High	106.04	90.73-121.34	0.002			
Low	64.38	53.43-75.32				
CD8						
High	101.53	86.49-116.56	0.016			
Low	67.34	55.8-78.97				
CD4						
High	116.92	101.16-132.67	<0.001	0.448	0.154-1.299	0.139
Low	56.36	78.95-100.08		[0.391‡]	0.144-1.062	0.065]
PD-L1						
- Immune Cells						
Positive	63.03	49.19-76.86	0.428			
Negative	83.25	71.29-95.21				
- Tumor Cells						
Positive	119.56	90.57-148.56	0.003	0.878	0.474-1.625	0.678
Negative	68.23	59.05-77.53				
PD-1						
- Immune Cells						
Positive	56.51	45.99-67.02	0.001	1.176	0.730-1.895	0.505
Negative	95.07	80.32-109.82				
- Tumor Cells						
Positive	175.79	152.29-199.28	<0.001			
Negative	58.96	50.78-67.13				
UICC*CD4				1.430	0.879-2.327	0.150
				<b>[1.607‡]</b>	<b>1.014-2.546</b>	<b>0.044]</b>
PD-1*CD4				1.128	0.510-2.497	0.766

**Tabelle 5: Univariate und multivariate Überlebensanalyse einschließlich CD4 und PD-1 und PD-L1.**

CI: Konfidenzintervall; HR: Hazard Ratio. TILs wurden durch einen medianen Cutoff in hoch oder niedrig gruppiert. Das mittlere Überleben wird in Monaten des Überlebens angezeigt. Alle für die univariate Analyse signifikanten Faktoren wurden in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell analysiert. Die Referenzkategorien für die multivariate Analyse sind „niedrige Infiltration“ für CD3, CD4 und CD8, „niedrige CD4-Infiltration und UICC I + II“ für die Wechselwirkung zwischen CD4-Infiltration und UICC-Stadium, „niedrige CD4-Infiltration und PD-1 Expression negativ“ für die Wechselwirkung zwischen PD-1 Expression und CD4, „Alter ≤ 62 Jahre“ für Alter, „männlich“ für Geschlecht, „positiv“ für MSI-Zustand, „UICC I“ für UICC-Stadium, „R0“ für R, „negativ“ für PD-1 und PD-L1 und „intestinaler Typ“ für die Laurén-Klassifikation. Die Infiltration von CD3 und CD8<sup>+</sup> TIL sowie die Infiltration von PD-1 in Tumorzellen wurden aufgrund der hohen statistischen Korrelation von der multivariaten Analyse ausgeschlossen. Quelle: Literaturverzeichnis – Punkt Nr. (1), Supplement.

## 6. Klinische Anwendung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Infiltration mit CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten mit einem verbesserten Gesamtüberleben von Patienten mit Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Übergangs assoziiert ist. Weiterhin fand sich eine Assoziation dieses prognostischen Faktors zur PD-1 Expression auf Immunzellen: Wies der Tumor eine starke Infiltration mit Tumor infiltrierenden Lymphozyten auf und exprimierten diese Lymphozyten den Checkpoint-Rezeptor PD-1 nicht, war das Gesamtüberleben der Patienten vergleichsweise erhöht. Zeigte sich eine niedrige Infiltration mit Lymphozyten im Tumor, so war der PD-1 Expressionsstatus irrelevant im Hinblick auf die Prognose. Dieser Effekt war zudem vor allem in frühen Tumorstadien (UICC I und II) und nur in Karzinomen des Magens, nicht aber in den Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs erkennbar. Zusammengefasst deutet diese Arbeit darauf hin, dass eine hohe Anzahl an intratumoralen Immunzellen, welche keine potenzielle Inhibierung durch PD-1 erfahren haben, in frühen Tumorstadien zu einer deutlich verbesserten Prognose von Patienten mit Adenokarzinomen des Magens führen. (1)

Im Gegensatz zu vorliegenden Studien zum positiven prognostischen Einfluss einer Mikrosatelliteninstabilität (35, 36) zeigten die Patienten in dieser Studie ein signifikant verringertes Gesamtüberleben bei vorliegender Mikrosatelliteninstabilität. Dieser Effekt wurde mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Korrelation von Tumorstadium und MSI-Status verursacht. In der vorliegenden Arbeit befand sich der Großteil der Patienten mit Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität in fortgeschrittenen Tumorstadien. Die ausbleibende Signifikanz in multivariater Analyse bestätigt dies.



Wie bereits in der Einleitung angeführt, spielt die Forschung zur Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor aktuell eine große Rolle. Checkpoint-Inhibitoren wie der PD-1 Inhibitor Nivolumab werden bei verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise dem malignen Melanom bereits jetzt im klinischen Alltag genutzt (37). Bei Patienten mit AGÖ/M zeigen aktuelle Studien teilweise vielversprechende Ergebnisse, jedoch ist die Datenlage bislang unzureichend (25, 28, 38-40). Erschwerend für aktuelle Studien scheint unter anderem zu sein, dass ein einheitliches diagnostisches Regime für einen prädiktiven Marker, der das Ansprechen auf eine Immuntherapie prognostiziert, noch nicht eruiert werden konnte. Aktuell wird in Studien zu PD-1 Inhibitoren (Nivolumab, Pembrolizumab) oftmals PD-L1 als prädiktiver Marker eingesetzt, um zu entscheiden, wer in die Studie eingeschlossen wird (25, 38, 41). In einer Studie zu Nivolumab wurde allerdings gezeigt, dass ein Ansprechen der Patienten auf das Medikament bei sowohl positiver als auch negativer PD-L1 Expression vorhanden war, was darauf schließen lässt, dass in dieser Kohorte PD-L1 möglicherweise nicht der optimale prädiktive Marker ist (42). Auch in einer Studie von Kang et. al zu Nivolumab bei Patienten asiatischer Herkunft wurde gezeigt, dass der PD-L1 Status keinen Einfluss auf die Effektivität des Medikamentes in dieser Kohorte hatte. Hier wurden Patienten unabhängig vom PD-L1 Status eingeschlossen (39). Eine Studie von Weinberg et al. stellte dar, dass PD-L1 ein insuffizienter Marker für die Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren ist (43).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie zeigt, dass die PD-1 Expression in Korrelation mit CD3<sup>+</sup> TILs den prädiktiven Wert auf günstige Weise beeinflussen könnte. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine Kohorte mit Patienten mit einer hohen Lymphozyteninfiltration sowie einer PD-1 Expression in TILs in AGÖ/M signifikant von einer Checkpoint-Inhibitor-Therapie profitieren könnte. Dementsprechend könnte die

Korrelation von TILs und PD-1 Expression einen neuen prognostischen Marker darstellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Immunabwehr eine wichtige Rolle für das Gesamtüberleben in frühen Stadien von Patienten mit AGÖ/M spielt und die Expression von PD-1 in TILs die Immunantwort auf den Tumor hemmen kann. (1)

## **7. Limitationen der eigenen Arbeit**

Als Limitationen dieser Arbeit lassen sich zunächst Schwierigkeiten, die in der Basis der gewählten Methodik liegen, anführen. Wenn Tumorproben mittels Tissuearray aufgearbeitet werden, kann naturgemäß stets nur ein bestimmter Bereich des Tumors abgebildet werden. Dieser Bereich wurde im Vorhinein von einem erfahrenen Pathologen als repräsentativ bewertet, jedoch wird durch diese Technik nicht einbezogen, dass kein Tumor in seiner Gesamtheit stets homogen ist. Auch tritt meist eine ungleiche Verteilung von TILs innerhalb des Tumors auf, was durch die TMA-Technik ebenfalls nicht adäquat einbezogen werden kann (44).

Zudem wurde in dieser Studie nicht zwischen Tumorzentrum und Tumorperipherie unterschieden, was in einer Studie von Galon et al. von prognostischer Signifikanz war (45).

Leider konnte eine ausreichende Interpretation der PD-1 und PD-L1 Expression nur in Lymphozyten, aber nicht im Tumorgewebe durchgeführt werden, da die Verteilung dort nicht gleichmäßig über alle UICC-Stadien vorlag. Univariat erhobene, signifikante Ergebnisse ließen sich in der multivariaten Analyse nicht bestätigen. Dies scheint daran zu liegen, dass Patienten mit einer PD-1 und PD-L1 Expression in Tumorzellen fast durchweg Tumore im UICC Stadium I vorwiesen.

Zu diskutieren ist ebenfalls die Problematik der ausgeschlossenen Fälle. Von 438 eingeschlossenen Patienten, konnten letztendlich 210 in die multivariate Analyse einbezogen werden. Dies lag an methodischen Problemen der Auswertung wie beispielsweise fehlendem Tumorgewebe im ausgewählten TMA sowie an der nicht unerheblichen Zahl der palliativen Operationen bei Patienten im UICC Stadium IV (115 Patienten). Die Retrospektivität der Studie bringt sowohl Vor- als auch Nachteile mit

sich. Einerseits sind die kurativen Therapieansätze durch das Fehlen der Option der perioperativen Chemotherapie als veraltet zu betrachten, andererseits ergab sich dadurch die Option, Untersuchungen an durchweg unbehandeltem Tumorgewebe, unabhängig vom Tumorstadium, durchzuführen.

Prinzipiell lässt sich sagen, dass die untersuchte Patientenkohorte mit 438 Patienten bzw. 210 Patienten für die multivariate Analyse als ausreichend einzustufen ist, um die Thematik bewerten zu können. Auch die doppelt-verblindete Datenerhebung und -auswertung mit Hilfe einer Statistikerin ist wissenschaftlich zufriedenstellend.

Diese Kohorte ist hinsichtlich der Patientencharakteristika ausreichend repräsentativ mit einer relativ gleichen Verteilung über die verschiedenen Parameter hinweg. (1)

## 8. Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Der in dieser Studie dargestellte Effekt eines schlechteren Outcomes von Patienten mit einer PD-1 Expression, welcher sich unabhängig vom TIL – Status darstellte, muss noch in weiteren Studien untersucht werden. Eine wesentliche Aufgabe wird sein, in bereits erfolgten Studien zu Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab (bspw. (26, 46)) zu überprüfen, ob der PD-1 Expressionsstatus in TILs und die Infiltration mit CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten einen Einfluss auf das Ansprechen auf eine Immuncheckpointinhibition hat. Nur so kann der prädiktive Wert einer erhöhten TIL – Infiltration in Zusammenhang mit einer negativen PD-1 Expression abschließend bestimmt werden.

In der Gruppe der Patienten mit Mikrosatelliteninstabilität sind die Gründe für ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Immuncheckpointinhibition, die Effektivität einer prä- und postoperativen additiven oder sogar alleinigen Immuncheckpointtherapie wesentliche Fragestellungen (47).

Zudem sollte in weiteren Studien untersucht werden, welchen Effekt das Tumorstadium auf die TIL-Infiltration hat und ob dieser ebenfalls auf frühe Stadien begrenzt ist. Auch die Frage, welche Immunmechanismen potenziell in fortgeschrittenen Stadien ihre Wirkung verlieren, bleibt bislang unbeantwortet.

Insgesamt wäre es wünschenswert, mit Hilfe verschiedener, prognostisch relevanter Faktoren eine Art Score für die Tumorumgebung zu entwickeln, ähnlich dem Immunoscore® im kolorektalen Karzinom (48, 49). Durch diesen können Typ, Quantität und Lokalisation von Tumor infiltrierenden Lymphozyten in kolorektalen Tumoren und somit auch die Prognose von den betreffenden Patienten bestimmt werden. Ein solcher Score wäre auch in der Diagnostik und Therapie des AGÖ/M von großem Vorteil. (1)

## 9. Literaturverzeichnis

1. Pöttsch M, Berg E, Hummel M, Stein U, Winterfeld MV, Jöhrens K, Rau B, Daum S, Treese C. Better prognosis of gastric cancer patients with high levels of tumor infiltrating lymphocytes is counteracted by PD-1 expression. *Oncolmmunology*. 2020;9(1).
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
3. Lee YC, Chiang TH, Chou CK, Tu YK, Liao WC, Wu MS, Graham DY. Association Between Helicobacter pylori Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1113-24 e5.
4. Roberts SE, Morrison-Rees S, Samuel DG, Thorne K, Akbari A, Williams JG. Review article: the prevalence of Helicobacter pylori and the incidence of gastric cancer across Europe. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(3):334-45.
5. Tytgat GN. Recent developments in gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus: ANNO 2012. *J Dig Dis*. 2012;13(6):291-5.
6. Möhler M. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, 2019 AWMF Registernummer: 032/009OL 2019 [
7. Cammerer G, Formentini A, Karletshofer M, Henne-Bruns D, Kornmann M. Evaluation of important prognostic clinical and pathological factors in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2012;32(5):1839-42.
8. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(3):153-62.
9. Petrelli F, Ghidini M, Cabiddu M, Pezzica E, Corti D, Turati L, Costanzo A, Varricchio A, Ghidini A, Barni S, Tomasello G. Microsatellite Instability and Survival in Stage II Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Res*. 2019;39(12):6431-41.
10. Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS, Miller VA, Lim D, Amanam I, Chao J, Catenacci D, Cho M, Braiteh F, Klempner SJ, Ali SM, Fakih M. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(7):1096-103.
11. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Hübner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA, Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.
12. Fang WL, Chang SC, Lan YT, Huang KH, Chen JH, Lo SS, Hsieh MC, Li AF, Wu CW, Chiou SH. Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery. *World J Surg*. 2012;36(9):2131-8.
13. Parmiani G. Tumor-infiltrating T cells--friend or foe of neoplastic cells? *N Engl J Med*. 2005;353(25):2640-1.

14. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
15. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006;12(19):2979-90.
16. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;148(3):467-76.
17. Al-Rajhi N, Soudy H, Ahmed SA, Elhassan T, Mohammed SF, Khoja HA, Ghebeh H. CD3+T-lymphocyte infiltration is an independent prognostic factor for advanced nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):240.
18. Prall F, Duhrkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, Barten M. Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol*. 2004;35(7):808-16.
19. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Kataja V, Desmedt C, Piccart MJ, Loibl S, Denkert C, Smyth MJ, Joensuu H, Sotiriou C. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1544-50.
20. Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Hu W, Zhou Q, Chen L, Zhang D, Wu C, Jiang J. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophagus Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(2):720-32.
21. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(10):1704-11.
22. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):467-77.
23. Seliger B. Basis of PD1/PD-L1 Therapies. *J Clin Med*. 2019;8(12).
24. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(4):847-56.
25. Doi T, Piha-Paul SA, Jalal SI, Saraf S, Lunceford J, Koshiji M, Bennouna J. Safety and Antitumor Activity of the Anti-Programmed Death-1 Antibody Pembrolizumab in Patients With Advanced Esophageal Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(1):61-7.
26. Xu W, Atkins MB, McDermott DF. Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2020;17(3):137-50.
27. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, Domine M, Clingan P, Hochmair MJ, Powell SF, Cheng SY, Bischoff HG, Peled N, Grossi F, Jennens RR, Reck M, Hui R, Garon EB, Boyer M, Rubio-Viqueira B, Novello S, Kurata T, Gray JE, Vida J, Wei Z, Yang J, Raftopoulos H, Pietanza MC, Garassino MC, Investigators K. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(22):2078-92.
28. Shitara K, Van Cutsem E, Bang YJ, Fuchs C, Wyrwicz L, Lee KW, Kudaba I, Garrido M, Chung HC, Lee J, Castro HR, Mansoor W, Braghiroli MI, Karaseva N, Caglevic C,

Villanueva L, Goekkurt E, Satake H, Enzinger P, Alsina M, Benson A, Chao J, Ko AH, Wainberg ZA, Kher U, Shah S, Kang SP, Tabernero J. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer: The KEYNOTE-062 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020;6(10):1571-80.

29. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Kwon ED. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006;66(7):3381-5.

30. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, Budczies J, Bockmayr M, Dietel M, Denkert C, Braicu I, Johrens K. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(2):1486-99.

31. Boger C, Behrens HM, Mathiak M, Kruger S, Kalthoff H, Rocken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget.* 2016;7(17):24269-83.

32. Wu Y, Cao D, Qu L, Cao X, Jia Z, Zhao T, Wang Q, Jiang J. PD-1 and PD-L1 co-expression predicts favorable prognosis in gastric cancer. *Oncotarget.* 2017;8(38):64066-82.

33. Plesca I, Tunger A, Muller L, Wehner R, Lai X, Grimm MO, Rutella S, Bachmann M, Schmitz M. Characteristics of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Prior to and During Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front Immunol.* 2020;11:364.

34. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Research and Treatment.* 2006;100(2):229-35.

35. Giampieri R, Maccaroni E, Mandolesi A, Del Prete M, Andrikou K, Faloppi L, Bittoni A, Bianconi M, Scarpelli M, Bracci R, Scartozzi M, Cascinu S. Mismatch repair deficiency may affect clinical outcome through immune response activation in metastatic gastric cancer patients receiving first-line chemotherapy. *Gastric Cancer.* 2017;20(1):156-63.

36. Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, Tan P, Roviello F. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg.* 2018;105(3):159-67.

37. Carreau NA, Pavlick AC. Nivolumab and ipilimumab: immunotherapy for treatment of malignant melanoma. *Future Oncol.* 2019;15(4):349-58.

38. Shitara K, Özgüroğlu M, Bang Y-J, Di Bartolomeo M, Mandalà M, Ryu M-H, Fornaro L, Olesiński T, Caglevic C, Chung HC, Muro K, Goekkurt E, Mansoor W, McDermott RS, Shacham-Shmueli E, Chen X, Mayo C, Kang SP, Ohtsu A, Fuchs CS, Lerzo G, O'Connor JM, Mendez GA, Lynam J, Tebbutt N, Wong M, Strickland A, Karapetis C, Goldstein D, Vasey P, Van Laethem J-L, Van Cutsem E, Berry S, Vincent M, Muller B, Rey F, Zambrano A, Guerra J, Krogh M, Baeksgaard L, Yilmaz M, Elme A, Magi A, Auvinen P, Alanko T, Moehler M, Kunzmann V, Seufferlein T, Thuss-Patience P, Goekkurt E, Hoehler T, Haag G, Al-Batran S-E, Castro H, Lopez K, Aguilar Vasquez M, Sandoval M, Lam KO, Cuffe S, Kelly C, Geva R, Shacham-Shmueli E, Hubert A, Beny A, Brenner B, Giuseppe A, Falcone A, Maiello E, Passalacqua R, Montesarchio V, Hara H, Chin K, Nishina T, Komatsu Y, Machida N, Hironaka S, Satoh T, Tamura T, Sugimoto N, Cho H, Omuro Y, Kato K, Goto M, Hyodo I, Yoshida K, Baba H, Esaki T, Furuse J, Wan Mohammed WZ, Hernandez Hernandez C, Casas Garcia J, Dominguez Andrade A, Clarke K, Hjortland G, Glenjen N, Kubiawski T,



Jacek J, Wojtukiewicz M, Lazarev S, Lancukhay Y, Afanasayev S, Moiseyenko V, Kostorov V, Protsenko S, Shirinkin V, Sakaeva D, Fadeeva N, Yong WP, Ng CHM, Robertson B, Rapaport B, Cohen G, Dreosti L, Ruff P, Jacobs C, Landers G, Szpak W, Roh S-Y, Lee J, Kim YH, Bang Y-J, Chung HC, Ryu M-H, Alsina Maqueda M, Longo Munoz F, Cervantes Aguilar A, Aranda Aguilar E, Garcia Alfonso P, Rivera F, Feliu Batle J, Pazo Cid R, Yeh K-H, Chen J-S, Chao Y, Yen C-J, Özgüroğlu M, Kara O, Yalcin S, Hochhauser D, Chau I, Benson A, Shankaran V, Shaib W, Philip P, Sharma V, Siegel R, Sun W, Wainberg Z, George B, Bullock A, Myrick S, Faruol J, Siegel R, Larson T, Becerra C, Ratnam S, Richards DA, Riche SL. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2018;392(10142):123-33.

39. Kang Y-K, Boku N, Satoh T, Ryu M-H, Chao Y, Kato K, Chung HC, Chen J-S, Muro K, Kang WK, Yeh K-H, Yoshikawa T, Oh SC, Bai L-Y, Tamura T, Lee K-W, Hamamoto Y, Kim JG, Chin K, Oh D-Y, Minashi K, Cho JY, Tsuda M, Chen L-T. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;390(10111):2461-71.

40. Boku N, Ryu MH, Kato K, Chung HC, Minashi K, Lee KW, Cho H, Kang WK, Komatsu Y, Tsuda M, Yamaguchi K, Hara H, Fumita S, Azuma M, Chen LT, Kang YK. Safety and efficacy of nivolumab in combination with S-1/capecitabine plus oxaliplatin in patients with previously untreated, unresectable, advanced, or recurrent gastric/gastroesophageal junction cancer: interim results of a randomized, phase II trial (ATTRACTION-4). *Ann Oncol*. 2019;30(2):250-8.

41. Muro K, Chung HC, Shankaran V, Geva R, Catenacci D, Gupta S, Eder JP, Golan T, Le DT, Burtness B, McRee AJ, Lin C-C, Pathiraja K, Lunceford J, Emancipator K, Juco J, Koshiji M, Bang Y-J. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):717-26.

42. Smith KM, Desai J. Nivolumab for the treatment of colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(7):611-8.

43. Weinberg BA, Xiu J, Hwang JJ, Shields AF, Salem ME, Marshall JL. Immuno-Oncology Biomarkers for Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma: Why PD-L1 Testing May Not Be Enough. *Oncologist*. 2018;23(10):1171-7.

44. Khouja MH, Baekelandt M, Sarab A, Nesland JM, Holm R. Limitations of tissue microarrays compared with whole tissue sections in survival analysis. *Oncol Lett*. 2010;1(5):827-31.

45. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.

46. Park R, Williamson S, Kasi A, Saeed A. Immune Therapeutics in the Treatment of Advanced Gastric and Esophageal Cancer. *Anticancer Res*. 2018;38(10):5569-80.

47. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, Geva R, Gottfried M, Penel N, Hansen AR, Piha-Paul SA, Doi T, Gao B, Chung HC, Lopez-Martin J, Bang YJ, Frommer RS, Shah M, Ghori R, Joe AK, Pruitt SK, Diaz LA. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch

Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(1):1-10.

48. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-102.

49. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scipicariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pages F. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232(2):199-209.

## 10. Eidesstaatliche Erklärung

„Ich, Michelle Pöttsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „PD-1 Expression beeinflusst den prognostischen Wert von Tumor infiltrierenden Lymphozyten bei Patienten mit Adenokarzinomen des Magens“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## 11. Eigenanteil an der vorliegenden Arbeit

Publikation:

M. Pötzsch, E. Berg, M. Hummel, U. Stein, M. von Winterfeld, K. Jöhrens, B. Rau, S. Daum, C. Treese. Better prognosis of gastric cancer patients with high levels of tumor infiltrating lymphocytes is counteracted by PD-1 expression, *Oncolmmunology* 2020; 9:1, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1824632>.

Michelle Pötzsch hatte folgenden Anteil an der erfolgten Publikation:

- Literaturrecherche
- Anlegen eines neuen Datensatzes und Erweiterung eines bestehenden Datensatzes
- Gewinnung der Primärdaten (Analyse der TMAs)
- Auswertung der Primärdaten mit Hilfestellung einer Statistikerin (Annahme von Hilfe, jedoch selbstständige Auswertung) und Mithilfe der Interpretation der gewonnenen Daten
- Erstellung des Manuskripts (insbesondere Einleitung, Methodik, Ergebnisteil, Diskussion)
- Erstellung graphischer Darstellungen (Abbildungen 1,2,3; Supplement Abbildungen S1, S2, S3, S4)
- Erstellung der Tabellen (Tabelle 2; Supplement Tabelle S1, S2, S3, S4, S4 (2), S5)
- Bearbeitung der Revision

---

Datum

---

Unterschrift

## 12. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2018 Selected Editions: SCIE,SSCI

Selected Categories: "ONCOLOGY" Selected Category Scheme: WoS

Platz 45 von 229 Journalen aus der Kategorie „Oncology“

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	32,410	223.679	0.077370
2	NATURE REVIEWS CANCER	50,529	51.848	0.074080
3	LANCET ONCOLOGY	48,822	35.386	0.146770
4	Nature Reviews Clinical Oncology	9,626	34.106	0.031890
5	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	154,029	28.245	0.281750
6	Cancer Discovery	13,715	26.370	0.064810
7	CANCER CELL	36,056	23.916	0.091050
8	JAMA Oncology	9,488	22.416	0.048340
9	ANNALS OF ONCOLOGY	40,751	14.196	0.103620
10	Journal of Thoracic Oncology	16,601	12.460	0.038810
11	Molecular Cancer	11,626	10.679	0.021350
12	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	36,790	10.211	0.051650
13	NEURO-ONCOLOGY	11,858	10.091	0.029150
14	LEUKEMIA	24,555	9.944	0.054750
15	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	6,992	9.658	0.010730
16	CLINICAL CANCER RESEARCH	78,171	8.911	0.134870
17	Trends in Cancer	1,420	8.884	0.006040
18	Journal of Hematology & Oncology	5,366	8.731	0.013620
19	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	2,716	8.676	0.011350
20	Cancer Immunology Research	5,420	8.619	0.025380
21	CANCER RESEARCH	130,932	8.378	0.123870
22	CANCER TREATMENT REVIEWS	8,419	8.332	0.016930

23	Blood Cancer Journal	2,247	7.895	0.009060
24	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	5,746	7.570	0.019940
25	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,226	6.887	0.008260
26	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	30,731	6.680	0.055220
27	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	6,011	6.667	0.006220
28	ONCOGENE	63,249	6.634	0.074600
29	CANCER LETTERS	30,146	6.508	0.043780
30	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	45,833	6.203	0.046810
31	Cancers	5,196	6.162	0.011780
32	CANCER	67,408	6.102	0.071820
33	Oncogenesis	2,016	5.995	0.006360
34	Molecular Oncology	5,016	5.962	0.013590
35	Liver Cancer	769	5.944	0.002210
36	JOURNAL OF PATHOLOGY	15,994	5.942	0.021030
37	Molecular Therapy-Oncolytics	486	5.710	0.001990
38	BREAST CANCER RESEARCH	10,943	5.676	0.017310
39	Therapeutic Advances in Medical Oncology	1,377	5.670	0.003110
40	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	6,309	5.646	0.010260
41	STEM CELLS	21,467	5.614	0.030220
42	Gastric Cancer	4,454	5.554	0.008650
43	Clinical Epigenetics	2,900	5.496	0.009690
44	BRITISH JOURNAL OF CANCER	45,886	5.416	0.062950
<b>45</b>	<b>Oncolmmunology</b>	<b>7,790</b>	<b>5.333</b>	<b>0.025470</b>
46	ONCOLOGIST	11,831	5.252	0.021610
46	RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY	17,873	5.252	0.027470
48	CANCER EPIDEMIOLOGY	19,542	5.057	0.031380

	BIOMARKERS & PREVENTION			
49	CELLULAR ONCOLOGY	1,382	5.020	0.001960
50	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	7,401	5.012	0.012890
51	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	50,955	4.982	0.072280
52	BIODRUGS	1,685	4.903	0.003370
53	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	7,779	4.900	0.012870
54	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	18,062	4.856	0.029010
55	Translational Lung Cancer Research	1,542	4.806	0.005080
56	ENDOCRINE-RELATED CANCER	6,958	4.774	0.012150
57	CANCER SCIENCE	12,382	4.751	0.016610
58	American Journal of Cancer Research	4,359	4.737	0.010100
59	CANCER GENE THERAPY	2,842	4.681	0.003200
60	BONE MARROW TRANSPLANTATION	12,031	4.674	0.020710
61	Advances in Cancer Research	2,355	4.667	0.003750
62	ONCOLOGY RESEARCH	2,368	4.634	0.003170
63	PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISEASES	2,144	4.600	0.005380
64	LUNG CANCER	11,738	4.599	0.020200
65	MOLECULAR CANCER RESEARCH	7,899	4.484	0.013800

## 13. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

ONCOIMMUNOLOGY  
2020, VOL. 9, NO. 1, e1824632 (10 pages)  
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1824632>



ORIGINAL RESEARCH

OPEN ACCESS

## Better prognosis of gastric cancer patients with high levels of tumor infiltrating lymphocytes is counteracted by PD-1 expression

M. Pöttsch<sup>a,b</sup>, E. Berg<sup>a,b</sup>, M. Hummel<sup>a,c</sup>, U. Stein<sup>d,e</sup>, M. von Winterfeld<sup>f</sup>, K. Jöhrens<sup>g</sup>, B. Rau<sup>a,h</sup>, S. Daum<sup>a,b,i</sup>, and C. Treese<sup>a,b,d,i</sup>

<sup>a</sup>Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany; <sup>b</sup>Department of Gastroenterology, Infectious Diseases and Rheumatology, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany; <sup>c</sup>Institute for Pathology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany; <sup>d</sup>Experimental and Clinical Research Center, Charité - Universitätsmedizin, Berlin and Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Berlin, Germany; <sup>e</sup>German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany; <sup>f</sup>Institute of Pathology Heidelberg, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany; <sup>g</sup>Institute of Pathology, University Carl Gustav Carus, Dresden, Germany; <sup>h</sup>Department of Surgery, Campus Virchow-Klinikum and Charité Campus Mitte, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany; <sup>i</sup>Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

### ABSTRACT

The prognostic potential of anti-tumor immune responses is becoming increasingly important in adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and stomach (AGE/S) especially regarding the use of immune checkpoint inhibitors. This study analyzes for the first time the prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and checkpoint inhibitors in a large Caucasian cohort in patients with AGE/S. We screened tissue samples from 438 therapy-naïve patients with AGE/S undergoing surgery between 1992 and 2005, examined in a tissue microarray (TMA) and stained against human CD3, CD4, CD8, PD-1, and PD-L1. Out of 438 tissue samples, 210 were eligible for multivariate analysis. This revealed that high infiltration with CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup> TILs was associated with an increased overall survival in AGE/S patients, which could only be confirmed in multivariate analysis for CD3 (HR: 0.326;  $p = .023$ ). Independent improved survival was limited to gastric cancer patients and to early tumor stages as long as TILs did not express PD-1 (HR: 1.522;  $p = .021$ ). Subgroup analyses indicate that TIL-dependent anti-tumor immune response is only effective in gastric cancer patients in early stages of disease in PD-1 negative TILs. Combined analysis of PD-1 and CD3 could serve as a prognostic marker for the clinical outcome of gastric cancer patients and could also be of interest for immunotherapy.

### ARTICLE HISTORY

Received 3 June 2020  
Revised 2 September 2020  
Accepted 2 September 2020

### KEYWORDS

Gastric cancer; tumor-infiltrating lymphocytes; PD-1; biomarker

### 1. Introduction

Adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and stomach (AGE/S) represents the third most frequent tumor leading to death worldwide.<sup>1</sup> While the incidence of adenocarcinoma of the stomach has been constantly decreasing, mostly due to declining *Helicobacter pylori* (HP) infections, the frequency of AGE is increasing in the Western world. This is thought to be driven by a rising incidence of obesity and consecutive reflux disease.<sup>2–4</sup> The role of the immune system in tumor development and its role as a prognostic factor of the clinical course of gastric cancer and AGE/S are still controversially discussed.<sup>5</sup> On one hand, chronic inflammation due to HP-infection plays a significant role in gastric cancer development. On the other hand, lymphocytic infiltration is associated with clinical outcome in various tumor entities.<sup>6</sup> Expression of lymphocytes in tumor tissue correlates with an improved prognosis in different types of tumors such as breast cancer, esophageal squamous cell carcinoma, and colorectal cancer.<sup>7–9</sup> A study by Galon et al. in 2006 found a significant improvement in survival in colorectal cancer patients with high lymphocyte infiltration in the tumor tissue.<sup>10</sup> They especially differentiated between tumor margin and tumor center,

which lead to an improved accuracy in prediction of survival and ultimately to the “Immunoscore<sup>®</sup>”; however, prediction of benefit from adjuvant chemotherapy in stage II patients is missing.<sup>11</sup>

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have been investigated in several studies for AGE and gastric cancer patients. Thus, a study from 2001 indicated, that a high infiltration with CD8<sup>+</sup> lymphocytes is associated with a longer overall survival in a cohort of 70 patients with squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus.<sup>12</sup>

A meta-analysis from 2017 including 31 studies and 4185 patients concerning the prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in gastric cancer identified a positive prognostic value of a high infiltration with CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes, but not for CD4<sup>+</sup> lymphocytes.<sup>13</sup> The minority of patients with gastric cancer in this analysis was of Caucasian origin (13.0%) with a maximum sample size of 110 patients.

Microsatellite instability (MSI), as a marker for a deficient mismatch-repair (MMR) system, is a histopathological parameter with the promising association to clinical parameters.<sup>14</sup> An MSI-high status correlates significantly with improved survival as well as lower risk of relapse in colorectal cancer

**CONTACT** C. Treese [Christoph.treese@charite.de](mailto:Christoph.treese@charite.de) Department of Gastroenterology, Infectious Diseases and Rheumatology, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin 12203, Germany

Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#).

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



patients, as stated in two meta-analyses including 71 studies in total.<sup>15,16</sup> MSI status also seems to predict clinical benefit of immune checkpoint inhibition in this entity.<sup>17,18</sup> The reason for this effect is the higher mutational burden caused by a deficient mismatch-repair system.<sup>18</sup> A high mutational burden leads to higher immunogenicity and therefore to a better response of immunotherapy.<sup>19</sup> Microsatellite instability has also been found to be of prognostic importance in gastric cancer patients.<sup>20</sup> A meta-analysis including 48 studies with a total of 18612 patients found a correlation between higher overall survival as well as lower tumor stages and MSI in gastric cancer.<sup>21</sup> An exploratory analysis of the MAGIC trial showed that patients with MSI-high gastroesophageal or gastric cancer treated by surgery only had a significantly better prognosis, whereas MSI-high AGE/S patients who received perioperative chemotherapy showed worse overall survival.<sup>22</sup>

Recently, the T-cell inhibitory receptor PD-1 and its ligand PD-L1 came into the focus of research, as they play a central role in the functional suppression of T cell-dependent immune responses and the subsequent immune evasion of cancer cells.<sup>23</sup> In different mice models by Lau et al., the absence of PD-L1 positive tumor cells improved the anti-tumor response of the host. PD-L1 deficiency in host immune cells led to a significantly higher rate of tumor regression with almost complete prevention of immunoevasion of the tumor.<sup>24</sup> The inhibition of PD-1 is therefore not only realized by tumor cells expressing PD-L1 but also by TILs. The inhibition of PD-1 targeting PD-1 and PD-L1 has evolved as a therapeutic option for the treatment of various tumor entities.<sup>25–27</sup> However, the prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in TILs appears to vary between tumor entities. Thus, Darb-Esfahani et al. observed a positive correlation between the overall survival of patients with ovarian cancer and a high expression of PD-1 and PD-L1 in TILs, whereas Thompson et al. described the opposite effect in renal cell carcinoma.<sup>28,29</sup> In Caucasian gastric cancer patients, PD-L1 expression in TILs has been correlated with an increased survival in univariate, but only partly in multivariate analyses.<sup>30</sup>

Due to these contradictory data, we examined the prognostic value of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> TILs and PD-1 and PD-L1 expression in tumor cells and TILs in a large, thoroughly characterized, therapy-naïve, Caucasian AGE/S cohort with respect to well-known clinical prognostic parameters including histology subtypes and clinical tumor stages.<sup>31</sup>

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

Clinical data from patients with AGE/S of all tumor stages, with and without distant and lymph node metastasis and venous and lymphatic infiltration, primarily treated by surgery between 1992 and 2004 at the Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Buch, were collected retrospectively.

Overall survival was defined as time from diagnosis to death or last follow-up. Tumor-related survival was defined as time from diagnosis to tumor-related death or last follow-up. The data regarding patient characteristics and follow-up

information were retrieved from the patient management software (SAP®) and the regional population-based cancer registry (“Gemeinsames Krebsregister”). The study was approved by the Institutional Review Board of the Charité (EA4/115/10) and conducted accordingly.

### 2.2. Tissue samples

Tissue samples were collected from the archive of the Institute of Pathology, Charité – Universitätsmedizin Berlin. Four hundred thirty-eight samples of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue were available of chemotherapy-naïve patients undergoing surgery. Tissue samples were reevaluated for postoperative histological diagnosis, tumor stage, grading, and were morphologically classified using the Laurén and Ming classification by a pathologist with a special focus on gastrointestinal pathology (M.W.). Additional data concerning tumor size, depth of invasion, and tumor invasion of veins or lymphatic vessels were obtained from the Charité – Universitätsmedizin Berlin patient management software.

### 2.3. Tissue microarray and immunohistochemistry

Tissue samples were screened using Hematoxylin- and Eosin-stained sections for representative areas of solid tumors. Two 1 mm-diameter tissue cores were punched out of the central tumor region from each of the 438 available samples and transferred to a recipient paraffin block. After re-melting, sections (4 µm thick) were consecutively cut from each tissue microarray (TMA) block. Hematoxylin and Eosin staining was performed on TMA sections for reconfirmation of tumor and non-tumor tissue.

Only TMA cores that contained representative tumor sections were considered for subsequent analyses (Figure 1).

For checkpoint proteins PD-1 and PD-L1, automated immunohistochemistry was performed on 2 µm thick slides of paraffin-embedded tissue with Leica BOND-max<sup>TM</sup> immunostainer (Leica Microsystems) using the Bond Polymer Refine (a peroxidase-based detection reagent). The slides were counterstained with Hematoxylin (Figure 2). For mismatch-repair proteins, immunohistochemistry was performed on an automated staining system (BenchMark Ultra, Roche Ventana, Germany) using prediluted antibodies. For a detailed version of the visualizing agents, see Table S1 in the supplement.

All cases were evaluated by two experts blinded to the patients' clinical information visualized in one high power field in two cores per tumor sample. Representative areas from each core were chosen for TIL counting. Due to the procedure of cutting and staining, some samples could not be used for the evaluation. Samples with insufficiently representative tumor tissue were also excluded from the evaluation. The average of positive cells was calculated per square millimeter. The representativity of each core was jointly discussed and cases with diverging results were analyzed in detail. Detailed discussion was necessary in 62 cases for CD3, in 35 cases for CD4, and in 28 cases for CD8. PD-1 and PD-L1 were analyzed by two different experts using the CPS (combined positive score).

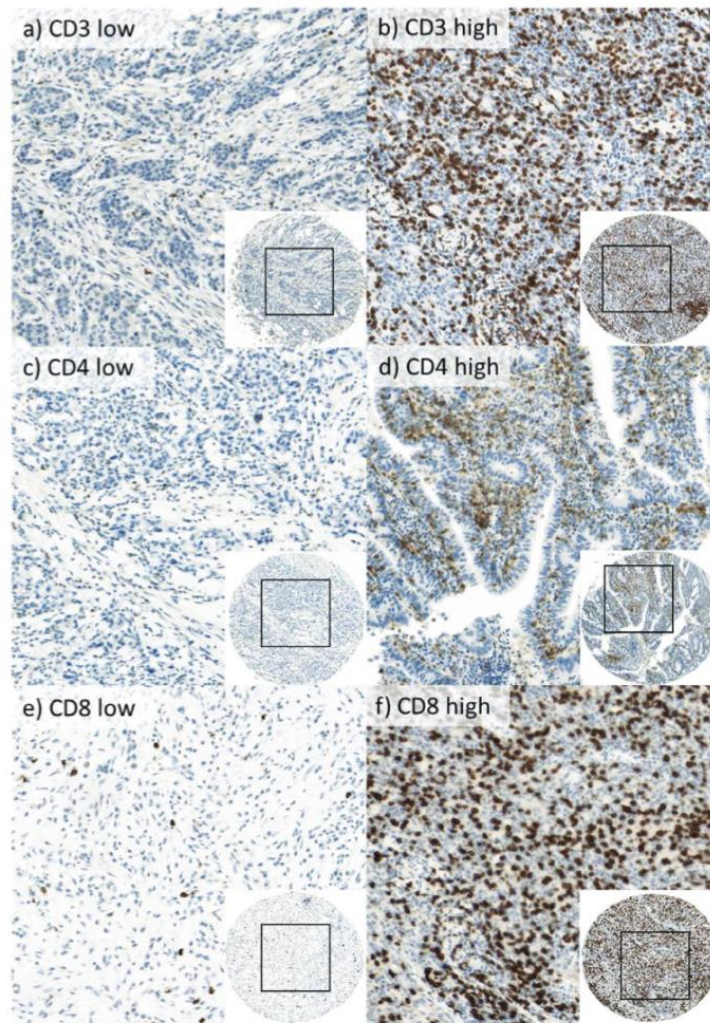


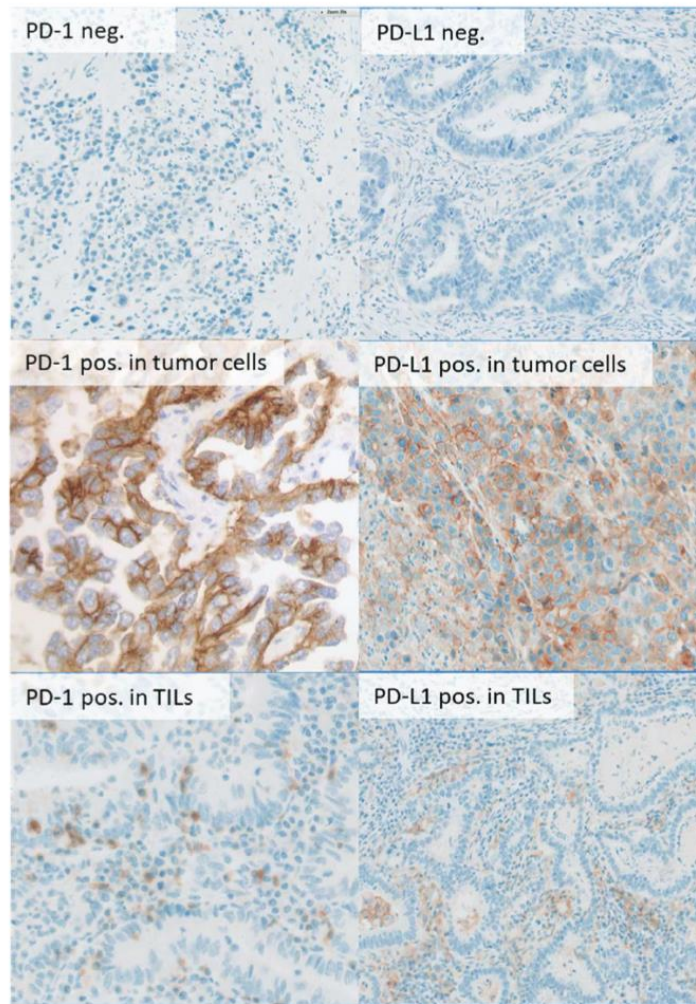
Figure 1. Immunohistological staining for CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> cells in 400-fold magnification. Tumor samples were grouped into a low or high state of infiltration with CD3, CD4, or CD8 positive TILs by using the median.

#### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the IBM SPSS software Version 24. Because TILs were not normally distributed, they were grouped in high and low by using the median, not the mean, as a cutoff. The examination of survival analysis for quartiles showed a gradual decrease in survival from a high TIL infiltration to a low TIL infiltration (see Figure S4). To simplify further analysis, we decided for binary categories by using the median for statistics. For PD-1 expression on immune cells,  $\geq 1\%$  was used as a cutoff. For the interpretation of the PD-L1

staining, the CPS (Combined Positive Score) with the cutoff  $\geq 1$  was chosen. Quantitative values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, median, range, and categorical values with absolute and relative frequencies (count and percent). Overall survival was evaluated using Kaplan–Meier plots. Associations of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup> densities with tumor size, distant and lymph node metastasis, venous and lymphatic infiltration, Laurén and Ming classification, grading, and UICC classification were tested using the chi-square-test (X<sup>2</sup>-test). Univariate survival analyses were performed according to the





**Figure 2.** Immunohistochemical staining for PD-1 and PD-L1 expression in tumor cells and TILs in 400fold (b,d,e) and 20fold (a,c,f) magnification. Samples were grouped into negative or positive with a cutoff value of >1% expression or with CPS > 1.

Kaplan–Meier method using log-rank test for the assessment of statistical significance. Cox regression was performed for multivariate analyses in a stepwise forward/backward selection with the level of significance set to  $p < .05$ . Due to a high correlation between  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , and  $CD8^+$ , we analyzed each factor in single cox-regression models.

Low  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , or  $CD8^+$  TILs states served as an analytical reference category in the multivariate analyses. For interaction analyses between  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , and  $CD8^+$  TILs state and UICC stage, a low TILs state and UICC stage I and II were used as a reference category.

Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK) were applied for this study whenever applicable.<sup>32</sup>

### 3. Results

#### 3.1. Patient characteristics

Data of 438 patients were collected for this study (female = 178, median age = 62 y) (95% CI: 60.97–63.15 y).

The detailed clinicopathological characteristics of our patient cohort are summarized in the supplement (see

Supplement Tables S2, S3, and S4). The mean follow-up was 121.7 months (95% CI: 113.9–129.5 months) and 291 patients (66.4%) died during follow-up time, 225 (51.4%) of those tumor-related. The 5-year overall survival was 38.1%, the 5-year tumor-related survival was 45.4%.

### 3.2. MMR status

Deficient mismatch repair (dMMR) was shown in 45 patients (10.3%) using immunohistochemical staining against MSH2 and MLH1, whereas 338 (77.2%) showed proficient mismatch repair (pMMR), in 55 patients (12.6%) MMR status was not evaluable. Mean survival was 47.22 months in dMMR patients and 79.78 months in pMMR patients ( $p = .025$ ). In this AGE/S cohort, dMMR patients were diagnosed in higher tumor stages compared to pMMR patients (dMMR: T1/T2: 40% T3/T4: 60% vs pMMR: T1/T2: 62%, T3/T4: 38% ( $x_2: p = .032$ ); Figure S2). Stage-related overall survival analyses showed no significant differences in the survival of dMMR and pMMR patients.

### 3.3. CD3, CD4 and CD8 expression

The significance of TILs in AGE/S in Caucasian patients is yet to be examined in larger cohorts. In order to determine the prognostic value of TILs in AGE/S, the expression of CD3, CD4, and CD8 in TILs was determined in tumor tissue, but not in non-neoplastic gastric and esophageal tissue. Out of 438 samples, 349 CD3, 335 CD4, and 344 CD8 stained samples were evaluable for the analysis. The analysis of the remaining samples was not possible due to missing representative tumor tissue in the respecting cores. Exemplary sample images of the analyzed IHC staining are shown in Figure 1. Examples for TIL count are shown in Figure S1 in the supplement.

The mean count of TILs/mm<sup>2</sup> was 122 in the CD3 low group and 513 in the CD3 high group, 30 in the CD4 low group and 251 in the CD4 high group and 74 in the CD8 low group, and 360 in the CD8 high group. High/low status of CD3 correlated strongly with the state of CD4 ( $p < .0001$ ) and CD8 ( $p < .0001$ ).

Patients with a high CD3<sup>+</sup> state showed a significantly increased mean overall survival in comparison to those with a low CD3 count (CD3: 106.04 months vs. 64.38 months;  $p = .002$ ). The same effect could be detected for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> (CD4: 116.91 months vs. 56.36 months;  $p < .001$ ; CD8: 101.53 months vs. 67.34 months;  $p = .016$ ) (Figure 3(a); Supplementary Figure S3(a,b)).

Subgroup analyses showed that the positive prognostic effects of TIL infiltration were limited to UICC stage I. In higher tumor stages, these effects were no longer detectable or even opposed in UICC stage III (Table 1, Figure 3(c); Supplementary Figure S3(c,d)).

To recognize confounding and interacting parameters, a multivariate and interaction analysis was performed with all parameters that reached statistical significance in the univariate analysis. For multivariate analysis, only cases with evaluable staining for each included marker were used ( $n = 210$ ). Due to the high correlation of CD3, CD4, and CD8 TIL state, these parameters were analyzed in separate cox-regression models. The multivariate analysis showed that a high CD3 state (CD3:

HR: 0.326;  $p = .023$ ) as well as the interaction between CD3<sup>+</sup> state and UICC stage are independent prognostic factors, but only in the backward analysis (CD3<sup>+</sup>UICC: HR: 1.949;  $p = .004$ ). The corresponding cox-regression models for high CD4 and CD8 infiltration showed neither significance for CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells nor significant interaction with UICC. Interaction between CD4<sup>+</sup> lymphocytes and UICC stage did only reach statistical significance in backward, but not in the forward analysis (CD4<sup>+</sup>UICC: HR: 1.607;  $p = .044$ ). All results of univariate and multivariate analysis are depicted in Table 2 as well as in the supplements (Tables S4, S5).

### 3.4. PD-L1 and PD-1 expression

PD-L1 and PD-1 expression was analyzed in tumor cells and in TILs. In 328 cases (74.9%) staining could be evaluated.

Depending on the presence or absence of PD-L1 and PD-1, we separated the findings in lymphocytes and tumor cells into two groups: PD-L1 and PD-1 positive and negative.

#### 3.4.1. PD-1

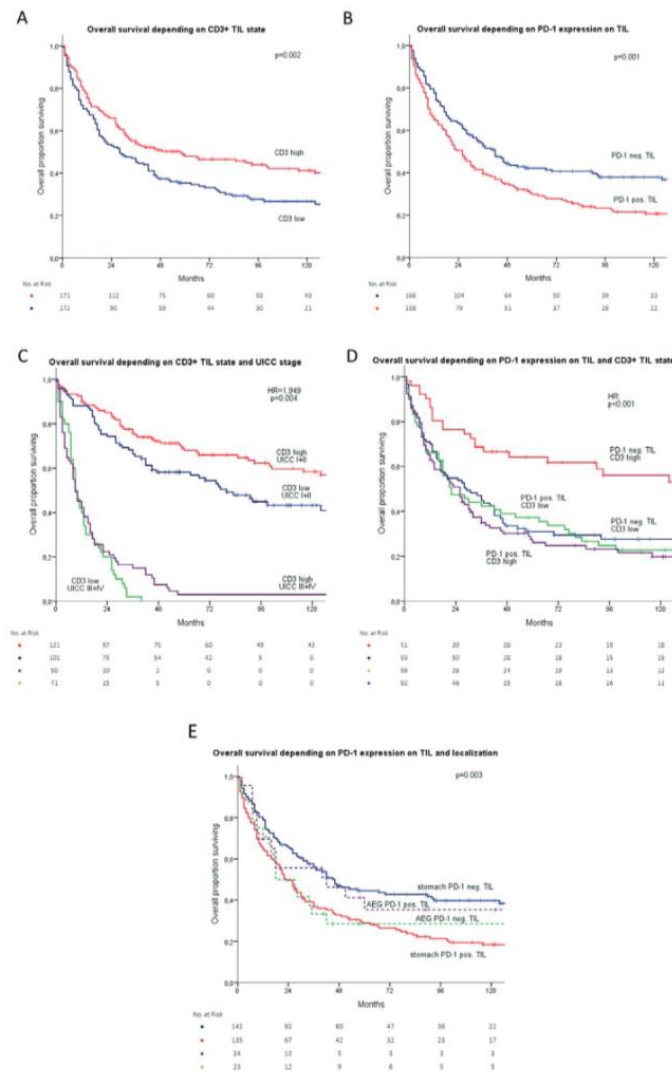
A significantly increased mean overall survival in univariate analysis was shown in the group with no PD-1 expression in TILs: neg: 95.07 months vs. pos: 56.51 months;  $p = .001$  (Figure 3(b)). PD-1 expression was strongly correlated to the state of CD3<sup>+</sup> TILs. Among all tumors, 30.9% ( $n = 92$ ) had a high CD3 state and were PD-1 positive in TILs and 17.4% ( $n = 52$ ) of those were PD-1 negative ( $x_2: p < .001$ ). The interaction between CD3 state and PD-1 expression in TILs also reached statistical significance in multivariate analysis, which makes it an independent prognostic marker (Figure 3(d)). The protective effect on overall survival of high CD3 state described above (see 3.2) was not detectable in patients with PD-1 expression in TILs (PD-1 pos: CD3 high vs low: 53.7 vs. 59.8 months  $p = .714$ ; PD-1 neg: 132.6 vs 65.9 months,  $p = .001$ ). The interaction between PD-1 expression and CD4 and CD8 state did not reach statistical significance (see Supplement Tables S4, S5). PD-1 expression in TILs was not significantly disbalanced over the UICC tumor stages (I: 41.1%, II 47.3%, III 64.4%, IV 51.2%;  $p = .066$ ).

PD-1 expression in tumor cells was only measurable in UICC I tumor samples; high significant differences in overall survival between PD-1 positive and negative tumors were therefore caused by this disbalanced expression pattern over the tumor stages: PD-1: neg. 58.96 months vs. pos. 175.79 months;  $p < .001$ . The positive prognostic effect of CD3 was not influenced by PD-L1 expression in tumor cells.

Due to the strong correlation to UICC stages, PD-1 expression in tumor cells was excluded from multivariate analyses.

#### 3.4.2. PD-L1

The expression of PD-L1 in TILs showed no effect on overall survival ( $p = .428$ ). PD-L1 expression in tumor cells was associated with a significantly higher mean survival in univariate analysis: 119.56 months vs. 68.23 months,  $p = .003$ . This effect was not confirmed in multivariate analysis (HR: 0.848;  $p = .580$ ). This might have been caused by the disbalanced distribution of PD-L1 positive tumor cells over the UICC stages in favor of early tumor stages (I: 25.7%, II: 6.3%, III: 6.5%, IV: 4.8%;



**Figure 3.** (a) Overall survival depending on high CD3 positive lymphocyte infiltration state. (b) Overall survival depending on PD-1 expression on tumor-infiltrating lymphocytes. (c) Overall survival depending on high CD3 positive lymphocyte infiltration state and UICC stage. PD-L1 positive tumor cells were detectable in 6.3% (n = 10) of tumors with low CD3 state and in 17.2% (n = 25) with high CD3 state (x2  $p < .003$ ). The prognostic effect of CD3 was not associated with PD-L1 state in tumor cells. All results of

$p < .0001$ ). In the stage-dependent subgroup analysis, PD-L1 expression in tumor cells had no effect on overall survival in any UICC stage. PD-L1 positive tumor cells were detectable in 6.3% (n = 10) of tumors with low CD3 state and in 17.2% (n = 25) with high CD3 state (x2  $p < .003$ ). The prognostic effect of CD3 was not associated with PD-L1 state in tumor cells. All results of

univariate and multivariate analysis are depicted in the supplement (Tables S4, S5).

### 3.5. Localization

Tumors were localized in 84.9% (n = 372) in the stomach and in 15.1% at the gastroesophageal junction (n = 66).



**Table 1.** Subgroup analyses: overall survival in months related to TIL infiltration state and UICC stage.

		TILs high		TILs low		p
		OS (Month)	OS (Month)	OS (Month)	OS (Month)	
CD3	UICC I	176.54	108.17		0.001	
	UICC II	57.77	79.86		0.341	
	UICC III	16.88	43.24		0.008	
	UICC IV	8.05	11.94		0.221	
	All	106.04	64.38		0.002	
CD4	UICC I	170.72	116.83		0.022	
	UICC II	59.14	64.76		0.306	
	UICC III	16.82	36.44		0.038	
	UICC IV	8.05	11.94		0.221	
	All	116.91	56.36		<0.001	
CD8	UICC I	168.74	118.41		0.042	
	UICC II	60.12	78.55		0.508	
	UICC III	26.0	28.15		0.644	
	UICC IV	9.9	11.33		0.789	
	All	101.53	67.34		0.016	

Tumor samples were grouped for low or high infiltration with CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup> TILs by using the median. Differences in overall survival were compared by Kaplan Meier using log rank.

Distribution over tumor stages was well balanced (AGE: UICC I/II: 24.9% and III/V 22.9%  $p = .107$ ). Localization did not influence median overall survival (AGE: 80.1 vs. stomach: 84.0 month;  $p = .799$ ). Furthermore, the localization did not influence the positive effect of CD3<sup>+</sup> TILs on overall survival (AGE: CD3 low 74.1 vs. 109.1 month ( $p = .276$ ); stomach: CD3 low 63.3 vs high 104.8 months ( $p = .004$ )). The negative prognostic effect of PD-1 expression in TILs could only be shown in the stomach subgroup (AGE: PD-1 TILs neg 65.5 vs 70.0 months;  $p = .636$ ); stomach: PD-1 TILs neg 98.9 vs 54.3 months ( $p < .001$ ) (Figure 3(e)).

#### 4. Discussion

The impact of TILs concerning Caucasian patients with AGE/S still lacks a solid analysis, since only small cohorts have been investigated so far.<sup>12,33</sup> Most existing data concern patients of Asian origin, which underlines the importance of our data in Caucasian patients.<sup>34,35</sup> Our data showed that increased infiltration with CD3<sup>+</sup> lymphocytes is an independent prognostic factor for increased overall survival in AGE/S patients in a large cohort with long follow-up data. With insight into subgroup analyses, this effect is however limited to early tumor stages. Thus, the positive prognostic effect of high TIL infiltration is restricted to tumors with PD-1 negative TILs. While the positive prognostic effect of CD3<sup>+</sup> cell infiltration was independent from tumor localization, the negative prognostic influence of PD-1 expression in TILs could only be shown in gastric cancer patients. Our findings suggest that immune defense exerts a significant role for the overall survival in early stages of AGE/S and the expression of PD-1 in TILs may inhibit the anti-tumorous immune response.

The reason why the positive prognostic effect of TILs on prognosis is limited to early tumor stages in our study remains unclear. The concept of acquired resistance and tumor immune evasion via mechanisms like direct interaction through T-regulatory cells (Tregs) or T-cell exhaustion might be of importance.<sup>6,36</sup> It has been stated in the past that the alteration of tumor reactivity toward TILs during tumor

progression could be caused by an immunosuppressive network in the tumor microenvironment.<sup>37</sup>

As already stated, a deficient MMR system improves prognosis in gastric cancer patients.<sup>21</sup> The reported higher response to immunotherapy caused by a higher immunogenicity in MSI-high tumors would be of high interest in this analysis. As opposed to existing data, patients in our study showed a significantly decreased overall survival with dMMR in univariate analyses. This effect was caused by significantly lower tumor stages of pMMR patients. Because of this imbalance in our cohort with MMR status being strongly dependent on tumor stage, independent interaction between MMR status and prognostic relevance of TILs could not be examined.

Immune therapeutic approaches have successfully been integrated into therapeutic routine in several disease entities but results in AGE/S are still unsatisfactory.<sup>38–40</sup> Studies concerning the treatment of AGE/S tumors with checkpoint inhibitor therapeutics such as Pembrolizumab are using PD-L1 as a single identification marker to evaluate the predictive value.<sup>40,41</sup> These unsatisfactory results may occur, because patient selection and predictive markers are yet to be improved.<sup>42</sup> This study indicates that PD-1 expression in correlation to CD3<sup>+</sup> TILs may influence the predictive value in a favorable way. Whilst overall survival significantly improved when CD3<sup>+</sup> lymphocyte infiltration was high and TILs did not express PD-1, this effect on survival was not found when PD-1 was expressed. This could indicate that patients with a high TIL state as well as a PD-1 expression in TILs in gastric cancer could significantly profit from checkpoint inhibitor therapy. This would concern 30.9% of patients in our study. This effect remains to be examined in further studies or could also be retrospectively evaluated in past studies.

There exist contradicting data about the association of PD-1/PD-L1 expression in AGE/S concerning the prognostic value on overall survival: whilst in accordance with our data several studies demonstrated a negative effect on overall survival,<sup>43</sup> Böger et al. indicated a positive correlation with longer survival

**Table 2.** Univariate and multivariate survival analyses including CD3, CD4, CD8 positive infiltration state and PD-1 and PD-L1 positive infiltration state.

Clinical Factor	Mean Survival	Univariate		Multiple Cox Regression (after forward/[backward] selection)		
		CI	p	HR	CI	p
Total patients	83.78	74.7–92.86				
Age						
≤ 62 years	97.85	84.97–110.72	<0.001	1.027	1.009–1.046	0.004
> 62 years	65.86	54.51–77.2		<b>1.025†</b>	<b>1.007–1.043</b>	<b>0.006</b>
Sex						
Female	96.82	81.88–111.76	<0.005	0.790	0.540–1.154	0.222
Male	72.92	62.09–83.75				
UICC stage						
UICC I	154.83	140.48–169.18	<0.001	2.484	1.964–3.142	<0.001
UICC II	70.16	56.53–83.79		<b>2.339†</b>	<b>1.839–2.976</b>	<b>&lt;0.001</b>
UICC III	26.65	16.61–36.68				
UICC IV	10.97	8.93–12				
R						
R0	116.82	105.42–128.22	<0.001	2.399	1.318–4.369	0.004
R1	23.91	8.53–39.28		<b>2.394†</b>	<b>1.329–4.313</b>	<b>0.004</b>
R2	7.0	7.0–7.0				
Palliative*	Censored					
Lauren						
Intestinal	95.96	82.01–109.91	0.002	1.182	0.913–1.530	0.205
Diffuse	69.83	56.78–82.86				
Mixed	69.34	51.39–87.4				
MMR						
dMMR	47.22	28.16–66.28	0.025	0.953	0.552–1.646	0.864
pMMR	79.78	70.15–89.39				
CD3						
High	106.04	90.73–121.34	0.002	0.315	0.109–0.908	0.032
Low	64.38	53.43–75.32		<b>[0.326†]</b>	<b>0.124–0.858</b>	<b>0.023</b>
CD8						
High	101.53	86.49–116.56	0.016			
Low	67.34	55.8–78.97				
CD4						
High	116.92	101.16–132.67	<0.001			
Low	56.36	78.95–100.08				
PD-L1						
• Immune CellsPositive	63.03	49.19–76.86	0.428	0.848	0.474–1.519	0.580
• Negative	83.25	71.29–95.21	0.003			
• Tumor CellsPositive	119.56	90.57–148.56				
• Negative	68.23	59.05–77.53				
PD-1						
• Immune CellsPositive	56.51	45.99–67.02	0.001	0.925	0.552–1.552	0.768
• Negative	95.07	80.32–109.82				
• Tumor CellsPositive	175.79	152.29–199.28	<0.001			
• Negative	58.96	50.78–67.13				
UICC*CD3				1.683	1.039–2.725	0.034
				<b>[1.949†]</b>	<b>1.242–3.059</b>	<b>0.004</b>
PD-1*CD3				1.556	0.690–3.508	0.286
				<b>1.522†</b>	<b>1.065–2.174</b>	<b>0.021</b>

CI: confidence interval; HR: hazard ratio. Multivariate analysis: n = 210. TILs were grouped into high or low by a median cutoff. Mean survival is shown in months of survival. All factors significant in univariate analysis were analyzed in a multivariate cox-regression model. The reference categories for multivariate analysis are "low infiltration" for CD3, CD4 and CD8, "low CD3 infiltration and UICC I + II" for interaction between CD3 and UICC stage, "low CD3 infiltration and PD-1 expression negative" for interaction between PD-1 expression and CD3, "patient age < 62 y" for age, "male" for sex, "positive" for MMR status, "UICC I" for UICC stage, "R0" for R, "negative" for PD-1 and PD-L1 and "intestinal type" for Lauren classification. CD4\* and CD8\* TILs infiltration as well as PD-1 infiltration in tumor cells were excluded from multivariate analysis due to high statistical correlation.

\* The resection state of the palliative cases was censored in multivariate confounder analysis, because of strong statistical interaction with UICC stage.

in patients with high expression of PD-L1 in tumor and in immune cells in a large Caucasian cohort.<sup>30</sup> A study by Thompson et al. indicated that the absence of PD-L1 positive tumor cells leads to improved overall survival in AGE/s patients.<sup>44</sup> Wu et al. detected a positive prognostic effect of PD-L1 expression in TILs in gastric cancer patients.<sup>45</sup> Because of an uneven distribution of PD-L1 expression throughout the UICC stages in our patient cohort, we could not reproduce these results.

The limitations of our study lay firstly in methodical issues concerning the Tissuearray technique. By using this technique, the evaluation of tumor tissue focuses on a distinct area of the tumor, which was chosen as representative for the tumor in its entirety. However, intratumoral heterogeneity as well as an uneven distribution of TILs throughout the tumor is clearly neglected by using this method and should be taken into consideration when assessing these data.<sup>46</sup> We were also unable to differentiate between invasive margin and tumor center, which

plays a significant prognostic role according to Galon et al.<sup>10</sup> A considerable number of patients had to be excluded for survival analysis for different reasons, such as palliative surgery or unevaluable staining. Overall, we performed multivariate analysis in 210 cases, which is still a large number for an AGE/S cohort. Lastly, we examined a cohort, which was treated between 1992 and 2005. These patients did not receive treatment by modern standards (e.g. perioperative chemotherapy), which makes it difficult to evaluate the data in these aspects. However, this gave us the opportunity to examine chemotherapy-naïve tumor tissue over all UICC stages, which allows better comparability.

Overall, we demonstrated a strong positive prognostic effect of CD3<sup>+</sup> and PD-1 negative tumor-infiltrating lymphocytes in early tumor stages for gastric cancer patients in a large AGE/S patient cohort. Our study has strong advantages with a high patient number, positive statistics in univariate and multivariate analyses, and a homogenous study population. In our cohort, the number of patients with early tumor stages is increased compared to other studies with Caucasian cohorts. This is certainly due to the retrospective design of the study. However, it is worth speculating that this increased patient number reached statistical significance to underline the role of the immune system in these tumor stages. Subgroup analyses based on immune cell infiltration could explain disappointing effects of checkpoint inhibitors as seen, e.g. in the Keynote 028, 061, and 062 studies.<sup>38,40,47</sup> Our data may help to identify high-risk groups in early tumor stages. The negative predictive value of the PD-1 expression in TILs could also be an indication that it can be of prognostic significance for evaluating the effectiveness of checkpoint inhibition.

#### Abbreviations

TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
AGE/S	Adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and stomach
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
MMR	mismatch repair
pMMR	proficient mismatch repair
dMMR	deficient mismatch repair

#### Acknowledgments

We are particularly indebted to Mrs. Andrea Stroux for the statistical assistance. This work was supported by the BIH Clinician scientist program. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

#### Funding

This work was supported by the Berlin Institute of Health [Clinician Scientist Program].

#### References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- Roberts SE, Morrison-Rees S, Samuel DG, Thorne K, Akbari A, Williams JG. Review article: the prevalence of *Helicobacter pylori* and the incidence of gastric cancer across Europe. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43:334–345. doi:10.1111/apt.13474.
- Abrams JA, Gonsalves L, Neugut AI. Diverging trends in the incidence of reflux-related and *Helicobacter pylori*-related gastric cardia cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47:322–327. doi:10.1097/MCG.0b013e318260177a.
- Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin.* 2013;63:232–248. doi:10.3322/caac.21185.
- Parmiani G. Tumor-infiltrating T cells - Friend or foe of neoplastic cells? *New Engl J Med.* 2005;353:2640–2641. doi:10.1056/NEJMp058236.
- Page F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010;29:1093–1102. doi:10.1038/ncr.2009.416.
- Kong JC, Guerra GR, Pham T, Mitchell C, Lynch AC, Warrier SK, Ramsay RG, Heriot AG. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum.* 2019;62:498–508. doi:10.1097/DCR.0000000000001332.
- Vihervuori H, Autere TA, Repo H, Kurki S, Kallio L, Lintunen MM, Talvinen K, Kronqvist P. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145:3105–3114. doi:10.1007/s00432-019-03036-5.
- Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14. doi:10.1186/bcr3148.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313:1960–1964. doi:10.1126/science.1129139.
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014;232:199–209. doi:10.1002/path.4287.
- Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61:3932–3936.
- Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Chen L, Zhou Q, Hu W, Zhang D, Wu C, Tao M, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8:57386–57398. doi:10.18632/oncotarget.18065.
- Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer: the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7:153–162. doi:10.1038/nrclinonc.2009.237.
- Petrelli F, Ghidini M, Cabiddu M, Pezzica E, Corti D, Turati L, Costanzo A, Varricchio A, Ghidini S, Barni S, et al. Microsatellite instability and survival in stage II colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res.* 2019;39:6431–6441. doi:10.21873/anticancer.13857.
- Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23:609–618. doi:10.1200/JCO.2005.01.086.
- Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *New Engl J Med.* 2015;372:2509–2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596.
- Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA. Mismatch repair deficiency and response to immune checkpoint blockade. *Oncologist.* 2016;21:1200–1211. doi:10.1634/theoncologist.2016-0046.
- Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS, Miller VA, Lim D, Amanam I, Chao J, et al. Tumor mutational



- burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Annal Oncol.* 2019;30:1096–1103. doi:10.1093/annonc/mdz134.
20. Fang WL, Chang SC, Lan YT, Huang KH, Chen JH, Lo SS, Hsieh M-C, Li AF-Y, Wu CW, Chiou SH, et al. Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery. *World J Surg.* 2012;36:2131–2138. doi:10.1007/s00268-012-1652-7.
  21. Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, Tan P, Roviello F, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg.* 2018;105:159–167. doi:10.1002/bjs.10663.
  22. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, Gonzalez D, Hulkkil-Wilson S, Eltahir Z, Fassan M, Rugge M, Valeri N, Okines A, et al. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol.* 2017;3:1197–1203. doi:10.1001/jamaoncol.2016.6762.
  23. Seliger B. Basis of PD1/PD-L1 Therapies. *J Clin Med.* 2019;8:2168. doi:10.3390/jcm8122168.
  24. Lau J, Cheung J, Navarro A, Lianoglou S, Haley B, Totpal K, Sanders L, Koeppen H, Caplazi P, McBride J, et al. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat Commun.* 2017;8:1–11. doi:10.1038/ncomms14572.
  25. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:467–477. doi:10.1038/nri2326.
  26. Sharon E, Streicher H, Goncalves P, Chen HX. Immune checkpoints in cancer clinical trials. *Chin J Cancer.* 2014;33:434–444. doi:10.5732/cjc.014.10122.
  27. La-Beck NM, Jean GW, Huynh C, Alzghari SK, Lowe DB. Immune checkpoint inhibitors: new insights and current place in cancer therapy. *Pharmacotherapy.* 2015;35:963–976. doi:10.1002/phar.1643.
  28. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehoul J, Wienert S, Lindner J, Bockmayr M, Dietel M, Denkert C, Braicu L, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget.* 2015;7:1486–1499. doi:10.18632/oncotarget.6429.
  29. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006;66:3381–3385. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4303.
  30. Böger C, Behrens HM, Mathiak M, Krüger S, Kalthoff H, Röcken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget.* 2016;7:24269–24283. doi:10.18632/oncotarget.8169.
  31. Arnold A, Daum S, von Winterfeld M, Berg E, Hummel M, Horst D, Rau B, U Stein U, Treese C. Analysis of NTRK expression in gastric and esophageal adenocarcinoma (AGE) with pan-TRK immunohistochemistry. *Pathol Res Pract.* 2019;215:152662. doi:10.1016/j.prp.2019.152662.
  32. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat.* 2006;100:229–235. doi:10.1007/s10549-006-9242-8.
  33. Chiaravalli AM, Feltri M, Bertolini V, Bagnoli E, Furlan D, Cerutti R, Capella C. Intratumour T cells, their activation status and survival in gastric carcinomas characterised for microsatellite instability and Epstein-Barr virus infection. *Virchows Arch.* 2006;448:344–353. doi:10.1007/s00428-005-0066-4.
  34. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:1064–1071. doi:10.1007/s00262-005-0092-8.
  35. Kim ST, Jeong H, Woo OH, Seo JH, Kim A, Lee ES, Shin SW, Kim YH, Kim JS, Park KH. Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 2013;36:224–231. doi:10.1097/COC.0b013e3182467d90.
  36. Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The immune system in cancer pathogenesis: potential therapeutic approaches. *J Immunol Res.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/4273943.
  37. Saleh R, Elkord E. Acquired resistance to cancer immunotherapy: role of tumor-mediated immunosuppression. *Semin Cancer Biol.* 2019;1–15. doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.017.
  38. Doi T, Piha-Paul SA, Jalal SI, Mai-Dang H, Saraf S, Koshiji M, Csiki I, Bennouna J. Updated results for the advanced esophageal carcinoma cohort of the phase 1b KEYNOTE-028 study of pembrolizumab. *J Clin Oncol.* 2016;34:4046. doi:10.1200/jco.2016.34.15\_suppl.4046.
  39. Doi T, Piha-Paul SA, Jalal SI, Saraf S, Lunceford J, Koshiji M, Bennouna J. Safety and antitumor activity of the anti-programmed death-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced esophageal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2018;36:61–67. doi:10.1200/JCO.2017.74.9846.
  40. Tabernero J, Van Cutsem E, Bang Y-J, Fuchs CS, Wyrwicz L, Lee KW, Kudaba I, Garrido M, Chung HC, Castro Salguero HR, et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy versus chemotherapy for advanced gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma: the phase III KEYNOTE-062 study. *J Clin Oncol.* 2019;37:LBA4007–LBA4007. doi:10.1200/JCO.2019.37.18\_suppl.LBA4007.
  41. Kawazoe A, Yamaguchi K, Yasui H, Negoro Y, Azuma M, Amagai K, Hara H, Baba H, Tsuda M, Hosaka H, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab in combination with S-1 plus oxaliplatin as a first-line treatment in patients with advanced gastric/gastroesophageal junction cancer: cohort 1 data from the KEYNOTE-659 phase IIb study. *Eur J Cancer.* 2020;129:97–106. doi:10.1016/j.ejca.2020.02.002.
  42. Weinberg BA, Xiu J, Hwang JJ, Shields AF, Salem ME, Marshall JL. Immuno-oncology biomarkers for gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: why PD-L1 testing may not be enough. *Oncologist.* 2018;23:1171–1177. doi:10.1634/theoncologist.2018-0034.
  43. Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, Zhong X, Li X, Qian H, Wang X. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2017;12:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0182692.
  44. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, Yang S, Duncan M, Ahuja N, Taube JM, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut.* 2016;66:794–801. doi:10.1136/gutjnl-2015-310839.
  45. Wu Y, Cao D, Qu L, Cao X, Jia Z, Zhao T, Zhao T, Wang Q, Jiang J. PD-1 and PD-L1 co-expression predicts favorable prognosis in gastric cancer. *Lancet Oncol.* 2008;9:279–287. doi:10.1016/S1470-2045(08)70072-X.
  46. Khouja MH, Baekelandt M, Sarab A, Nesland JM, Holm R. Limitations of tissue microarrays compared with whole tissue sections in survival analysis. *Oncol Lett.* 2010;1:827–831. doi:10.3892/ol.00000145.
  47. Shitara K, Özgüroğlu M, Bang YJ, Di Bartolomeo M, Mandalà M, Ryu MH, Fornaro L, Olesiński T, Caglevic C, Chung HC, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2018;392:123–133. doi:10.1016/S0140-6736(18)31257-1.

## **14. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 15. Publikationsliste

### Publikationen

**M. Pötzsch**, E. Berg, M. Hummel, U. Stein, M. von Winterfeld, K. Jöhrens, B. Rau, S. Daum, C. Treese. Better prognosis of gastric cancer patients with high levels of tumor infiltrating lymphocytes is counteracted by PD-1 expression, *Oncolmmunology* 2020; 9:1, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1824632>. **IF: 5.869**

### Kongressvorträge (Vortragende)

**International Gastric Cancer Congress**, Prag (CZE), 2019; Tumor infiltrating lymphocytes in adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and stomach: a strong predictor of survival in early tumor stages.  
Preis: „Best Poster Presentation“

**Deutscher Krebskongress**, Berlin (GER), 2018; Hohe Lymphozyteninfiltration als positiver prognostischer Marker bei Adenokarzinomen des Magens und gastroösophagealen Übergangs.

**Viszeralmedizin 2017**, Tagung von DGVS & DGAV, Dresden (GER); Hohe Lymphozyteninfiltration als positiver prognostischer Marker bei Adenokarzinomen des Magens und gastroösophagealen Übergangs.

## **16. Danksagung**

Danken möchte ich besonders meinem Doktorvater PD Dr. med. Severin Daum und meinem Promotionsbetreuer Dr. med. Christoph Treese, die mir das Thema anvertraut und mein wissenschaftliches Interesse maßgeblich gefördert haben. Ohne die strukturierte Anleitung, die immense Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden Herausforderungen und die engmaschige Betreuung wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere möchte ich mich für die große Unterstützung und die konstruktiven Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene bedanken, die diese Arbeit wegweisend beeinflusst haben.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Simone und Uwe, meinem Ehemann Lorenz, meiner Oma Rita, meiner Schwester Jenni und meiner besten Freundin Juliane, die mich in dieser Zeit stets unterstützt haben und mir mit Rat, Tat und Motivation zur Seite standen.