

Abschlussbericht für das durch Hamburger Krebshilfe geförderte Projekt

Vergleichende Analyse des Immunprofils im Knochenmark bei Patient:innen mit Knochenmarkkarzinose, Multiplem Myelom und ohne maligne Grunderkrankung: Immun-Funktioneller Status und therapeutische Implikationen

Dr. med. Franziska Brauneck

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

1.1 Antragsteller

Name: **Dr. med. Franziska Brauneck**
Institution und Abteilung: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Med II
Dienstliche Anschrift: Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Deutschland
Telefon: 040 741053679
E-Mail: f.brauneck@uke.de

1.2 Thema

Vergleichende Analyse des Immunprofils im Knochenmark bei Patient:innen mit Knochenmarkkarzinose, Multiplem Myelom und ohne maligne Grunderkrankung: Immun-funktioneller Status und therapeutische Implikationen

1.3 Zusammenfassung

Knochenmetastasen gehören zu den häufigsten Metastasierungsorten bei Tumorerkrankungen. Ziel der geförderten Studie war es, die Zusammensetzung der unterschiedlichen Immunzellpopulationen aus Aspiraten von Knochenmarkkarzinosen unterschiedlicher Tumorerkrankungen vor einer systemischen Therapie zu vergleichen. Die phänotypischen und funktionellen Analysen wurden mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie (MFC) durchgeführt. Die untersuchten Aspirete stammen aus Knochenmetastasen von am UKE behandelten Patientinnen mit Brustkrebs (BC, n = 6), Patienten mit Prostatakrebs (PC, n = 5), Patient:innen mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) (n = 7) und Patient:innen mit Myelom (MM, n = 10) sowie von Knochenaspiraten altersgleicher nicht-maligner Kontrollpersonen (NMC, n = 10). In allen Tumoraspiraten war der Anteil an CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zu der nicht-malignen Kontrollkohorte reduziert. Im Gegensatz ergaben unsere Untersuchungen eine signifikant erhöhte Infiltrationsrate an CD56⁺CD16⁻-NK-Zellen und CD163⁺CD86⁺-M2-ähnlichen Makrophagen in den Aspiraten der Patient:innen mit Tumorerkrankung im Vergleich zu den nicht-malignen Aspiraten. Im Hinblick auf neue immunologisch relevante Checkpoint-Moleküle wiesen CD8⁺-T-Zellen aus den Knochenmetastasen der Patient:innen eine signifikant häufigere Ko-Expression der inhibitorischen Rezeptoren TIGIT mit PVRL4 oder CD39 auf. Ebenso ko-exprimierten zytotoxische NK-Zellen dieser Tumor-Patient:innen TIGIT und PVRL4. Darüber hinaus wiesen M2-ähnliche Makrophagen der Tumor-Patient:innen im Vergleich zu den Aspiraten der nicht-malignen Kontrollkohorte eine erhöhte Untergruppe von Zellen auf, die entweder TIGIT und PVRL4 oder CD112 und CD155 ko-exprimierten. Anhand eines Myelom-Modells konnten wir in funktionellen In-vitro-Studien zeigen, dass die Blockade von TIGIT und CD39 zu einer signifikant erhöhten PBMC-vermittelten Lyse von Myelomzellen führen kann.

Damit belegt unsere Studie, dass im Knochenmark bei verschiedenen Tumorentitäten eine veränderte Zusammensetzung der Immunzellen vorliegt. Zudem werden ko-regulatorische Moleküle des TIGIT-Checkpoints sowie Ektoenzyme aus der purinergen Signalkaskade von in das Knochenmark

infiltrierenden CD8⁺-T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen abnormal exprimiert. Unsere funktionellen Untersuchungen zeigen darüber hinaus für das Multiple Myelom, dass diese abnormal exprimierten Moleküle relevant für die Immunzell-vermittelte Lyse von Tumorzellen sind. Die Daten wurden bereits veröffentlicht und sollen in weiteren in vivo Studien belegt werden. Hier ist geplant, die im Rahmen dieser Förderung erhobenen Daten, als Vordaten für ein weiteres Projektvorhaben bei der DFG einzureichen, um die in vivo Untersuchungen durchführen zu können. Der Antrag dazu soll 2026 eingereicht werden.

2. Hintergrund und Zielsetzung

Knochenmetastasen (BM) stellen bei allen Krebsarten eine der häufigsten Metastasierungsstellen dar [1]. Über 80 % der Patient:innen mit fortgeschrittenem Brustkrebs (BC) und Prostatakrebs (PC) sowie 30–40 % der Lungenkrebspatient:innen entwickeln Knochenmetastasen [2]. In einer aktuellen Studie wurde das Vorliegen von BM als unabhängiger Prädiktor für ein kürzeres Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) bei verschiedenen Krebsarten, darunter BC, PC und Lungenkrebs, identifiziert [3]. Zudem können BM die Lebensqualität unserer Patient:innen erheblich einschränken beispielsweise durch die Verursachung starker Schmerzen, eingeschränkte Mobilität, pathologische Frakturen, Rückenmarkskompressionen, Knochenmarkaplasie und Hyperkalzämie [4].

In den letzten zehn Jahren haben neue Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICIs) für die Behandlung unterschiedlicher metastasierter Malignome beeindruckende Ansprechraten und Vorteile hinsichtlich des Gesamtüberlebens gezeigt. Insbesondere ICIs, die gegen das programmierte Zelltod-Protein 1 (PD-1), dessen Liganden PD-L1 oder das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4) gerichtet sind, haben bei der Behandlung von Krebserkrankungen wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) außerordentliche Erfolge erzielt [5]. Dennoch weisen ein beträchtlicher Anteil der Krebspatient:innen entweder eine primäre oder eine erworbene Resistenz gegenüber ICIs auf [6]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind aktuell noch unzureichend verstanden. Zu den Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie die Immunantwort positiv beeinflussen, gehören ein hoher Grad an Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H), Defekte in einem Mismatch-Reparatur-Gen (dMMR), eine hohe Tumor-Mutationslast (TMB-H), die Infiltration von Immunzellen und der Grad der Checkpoint-Expression [7]. Wichtig ist, dass auch der Ort der Metastasierung die Wirksamkeit von ICIs bestimmen kann, wie aktuelle Studien zu Knochen- und Lebermetastasen mit besonders ungünstigen prognosen zeigen [8]. Es wurde nachgewiesen, dass die knochenspezifische Reaktion im Knochenmark mit den Überlebensergebnissen bei mit ICIs behandelten Patient:innen korreliert. Das Erreichen einer knochenspezifischen Reaktion/Ansprechen war beispielsweise bei NSCLC-Patient:innen mit einem längeren Gesamtüberleben (OS) und einem verlängerten progressionsfreien Überleben (PFS) verbunden [9].

Die spezifische immunsuppressive Mikroumgebung im Knochenmark, könnte also dazu führen, dass das Knochenmark resistent gegen ICIs wird [10]. Brustkrebs (BC) und nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC) gehören zu den häufigsten Krebsarten bei Frauen, während Prostatakrebs (PC) und NSCLC zu den häufigsten Krebsarten bei Männern zählen [11]. Zum Zeitpunkt unserer Studie waren ICIs für dreifach-negativen Brustkrebs und NSCLC zugelassen [12]. Für das multiple Myelom (MM) hingegen waren bereits verschiedene immuntherapeutische Strategien erfolgreich zugelassen oder in der

klinischen Erprobung [13]. In der von der Hamburger Krebsgesellschaft geförderten Studie verglichen wir systematisch das Immunprofil aus Knochenmarkaspiraten unbehandelter Patient:innen mit fortgeschrittenen Malignomdiagnosen (BC, PC, NSCLC) oder unbehandeltem MM mit Aspiraten einer Kontrollgruppe (NMC) vergleichbaren Alters.

Wir stellten die Hypothese auf, dass tumorinfiltriertes Knochenmark immunsuppressive Merkmale aufweist, die die Wirksamkeit der Immuntherapie beeinträchtigen. Daher untersuchten wir in der vorliegenden Studie T- NK-Zell- und Makrophagenpopulationen, sowie wichtige regulatorische Moleküle (TIGIT, PVRIG, CD112, CD155, PVRL4, CD39 und CD73). Durch die Identifizierung gemeinsamer und spezifischer Veränderungen bei verschiedenen Tumorentitäten war es unser Ziel, (neue) funktionell relevante immunmodulatorische Signalwege für die oben genannten Immunzellen aufzudecken und Erkenntnisse für zukünftige individualisierte immunbasierte Interventionen bei MM zu gewinnen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Infiltration von Immunzellen bei Knochenmetastasen unterscheidet sich je nach Tumorart

In der vorliegenden Studie wurden ausgewählte Immunzellpopulationen aus Knochenmarkaspiraten von 28 Spendern charakterisiert (BC $n = 6$, PC $n = 5$, NSCLC $n = 7$ und MM $n = 10$). Als Kontrolle wurden nicht-maligne Knochenmarkaspirate von Patient:innen mit ausgeschlossenen Malignomen (NMC $n = 10$) analysiert. MFC-Analysen von 3 Panels wurden ausgewertet, um T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen eindeutig zu unterscheiden. Unsere Studie differenzierte $CD3^+$ T-Zellen in $CD8^+/CD4^+$ T-Zellen, die gesamten NK-Zellen in $CD56^+CD16^-$, $CD56^+CD16^+$ und $CD56^-CD16^+$ und M0-Makrophagen wurden in M2-ähnliche $CD163^+CD86^+$ und M1-ähnliche $CD163^-CD86^+$ Subpopulationen unterschieden.

Innerhalb der Kohorten variierte die Infiltration von Immunzellen zwischen den Tumorentitäten. In BC-abgeleiteten Aspiraten wurde im Vergleich zur NMC-Kohorte eine erhöhte Häufigkeit von $CD3^+$ T-Zellen beobachtet. Die Häufigkeit von NK-Zellen war in NSCLC-Aspiraten im Vergleich zu NMCs sowie MM-Patient:innen erhöht. BM-Aspirate von PC- und MM-Patient:innen wiesen eine höhere Infiltrationsrate von Makrophagen auf als die in NMCs gefundene (Abbildung 1A).

Weitere Subanalysen der $CD3^+$ -T-Zellen ergaben, dass in PC-, NSCLC- und MM-Aspiraten die Häufigkeit von $CD8^+$ -T-Zellen im Vergleich zu NMC-Aspiraten signifikant reduziert war. Zudem zeigte unsere Studie einen Anstieg des Anteils an $CD4^+$ -T-Zellen in allen vier Tumorentitäten, der in den Aspiraten von BC- und MM-Patient:innen statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 1B).

Die Häufigkeit der zytotoxischen $CD56^-CD16^+$ -NK-Zell-Untergruppe war in der nicht-malignen und der malignen Gruppe ähnlich, mit Ausnahme der von NSCLC und MM stammenden Aspirate, in denen sie reduziert war (Abbildung 1C). Im Gegensatz dazu war die Häufigkeit regulatorischer $CD56^+CD16^-$ -NK-Zellen in Aspiraten von PC-, NSCLC- und MM-Patient:innen im Vergleich zu NMCs signifikant erhöht (Abbildung 1C).

Da Makrophagen grob in eher immunsuppressiv (M2-ähnlich) und entzündungsfördernd (M1-ähnlich) wirkende Untergruppen unterschieden werden können, erfolgte dies anhand der Expression von

CD163 und CD86. Im Vergleich zu NMCs zeigte sich in den PC- und MM Aspiraten eine signifikant verminderte Häufigkeit von CD86⁺CD163⁻ M1-ähnlichen Makrophagen. Im Gegensatz dazu war der Anteil an CD163⁺CD86⁺ M2-ähnlichen Makrophagen in allen vier Tumorentitäten im Vergleich zu den NMC-Aspiraten signifikant erhöht (Abbildung 1D).

Zusammengefasst enthielten die Asparate aller Tumorpatient:innen im Vergleich zu den NMC-Kontrollen einen geringeren Anteil an CD8⁺ T-Zellen und eine höhere Infiltration von immunsuppressiven NK-Zellen und Makrophagen. Es wurde kein charakteristischer Unterschied zwischen Aspiraten von soliden Tumoren und MM festgestellt.

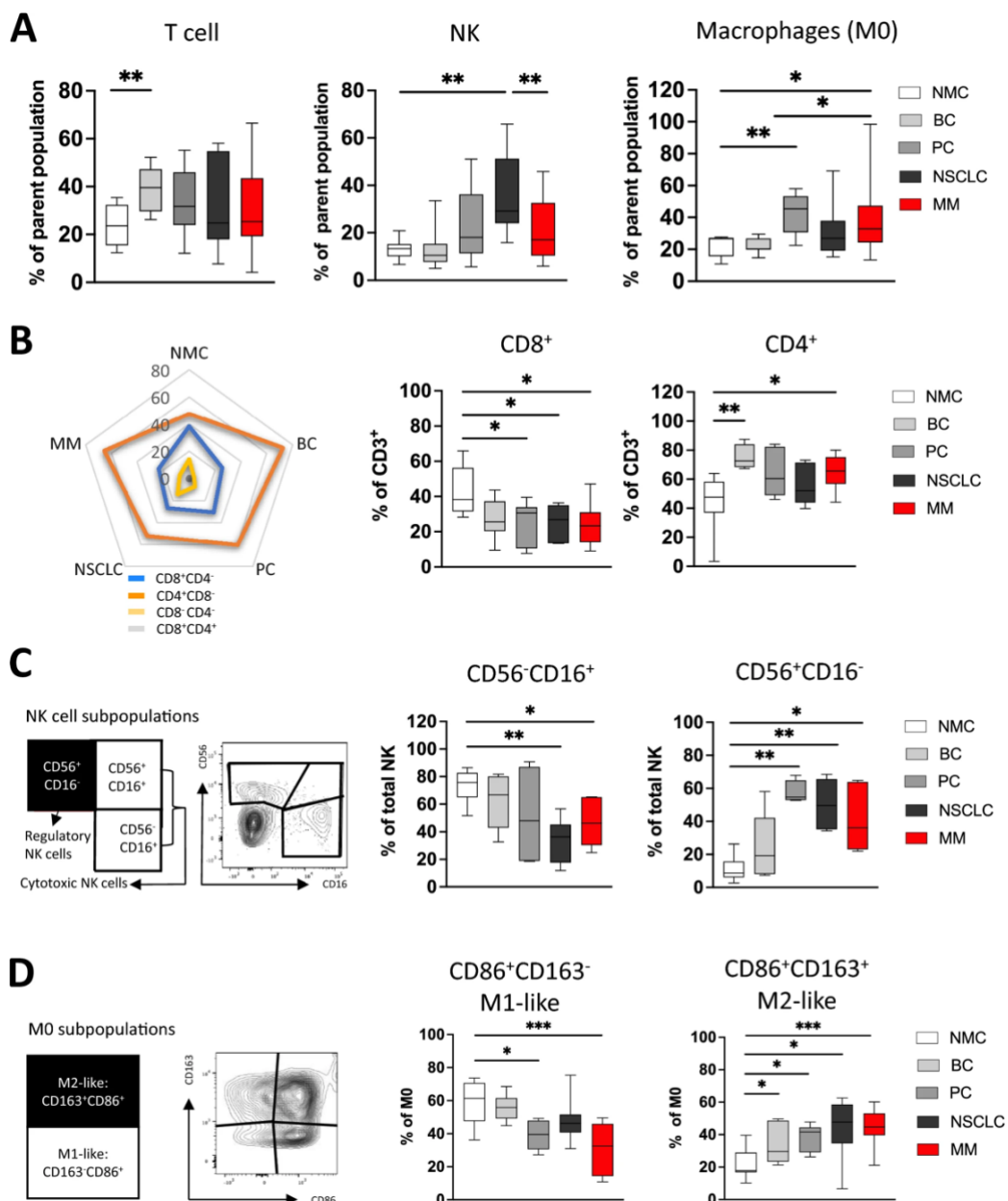


Abbildung 1

Multiparametrische Durchflusszytometrie-Analysen (MFC) von CD3⁺ T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen wurden unter Verwendung von 3 MFC-Panels durchgeführt. Es wurden Knochenaspirate von Patient:innen mit

unbehandeltem Brustkrebs (BC $n = 6$), Prostatakrebs (PC $n = 5$), nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC $n = 7$) und multiplem Myelom (MM $n = 10$) analysiert. Die malignen Aspirate wurden mit Knochenaspiraten von altersgleichen nicht-malignen Patient:innen verglichen, die sich einer Wirbelsäulenoperation unterzogen (NMC $n = 10$). **A** Infiltration von CD3⁺ T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen in den Knochenaspiraten. **B** Verteilung der CD3⁺ T-Zell-Subpopulationen basierend auf dem CD8- und CD4-Expressionsstatus. **C** Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen basierend auf dem CD56- und CD16-Status. **D** Beispielhafte FACS-Plots und zusammenfassende Daten vergleichen die (M1-ähnlichen) CD86⁺CD163⁻ und die suppressiven (M2-ähnlichen) CD163⁺CD86⁺ Makrophagen (CD68⁺CD14⁺). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.2 CD8⁺-T-Zellen aus Knochenmetastasen weisen eine erhöhte Frequenz an TIGIT⁺-Zellen auf, die PVRIG oder CD39 ko-exprimieren

Die vorliegende Studie zeigt einen heterogenen Expressionsstatus regulatorischer Moleküle über die verschiedenen Entitäten hinweg, mit großen Schwankungen in der Expression. Im Vergleich zu NMCs wiesen CD8⁺-T-Zellen aus BC-Aspiraten häufiger PVRIG⁺- und CD73⁺-Zellen auf, aus PC stammende CD8⁺-T-Zellen hatten einen erhöhten Anteil an TIGIT⁺-, PVRIG⁺- und CD39⁺-Zellen, aus NSCLC stammende CD8⁺-T-Zellen exprimierten häufiger CD73 auf ihrer Oberfläche, und aus MM stammende CD8⁺-T-Zellen exprimierten häufiger TIGIT, PVRIG, CD39 und CD73 (Abbildung 2A). Diese Expressionsmuster bestätigten sich auch bei der Auswertung der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) (Abbildung 2B-C). Da bei den CD4⁺-T-Zellen im Vergleich zu NMCs keine signifikanten Unterschiede in der Expression beobachtet wurden, konzentrierten sich die nachfolgenden Analysen auf CD8⁺-T-Zellen.

Interessanterweise bestand in allen malignen Knochenmarkaspiraten eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der TIGIT- und PVRIG- sowie CD39-Expression auf CD8⁺ T-Zellen (aufgrund der geringen Fallzahl wurden die malignen Kohorten hier zusammengefasst, Abbildung 2D). Um die Proteinexpression weiter zu kartieren, wurden tSNE-Analysen durchgeführt, die zeigten, dass TIGIT, PVRIG und CD39, nicht jedoch CD73, in denselben Untergruppen von aus dem Knochenmark stammenden CD8⁺ T-Zellen exprimiert wurden (Abb. 2E). Auf der Grundlage der tSNE-Ergebnisse wurde die individuelle Ko-expression der jeweiligen Moleküle TIGIT, PVRIG und CD39 analysiert. Wie beispielhaft in Abbildung 2F dargestellt, ko-exprimierten aus Knochenmarkaspiraten stammende CD8⁺-T-Zellen im Gegensatz zu NMCs über alle Tumorentitäten hinweg häufiger TIGIT und PVRIG. TIGIT und CD39 wurden in Knochenmarkaspiraten von PC- und MM-Patient:innen häufiger ko-exprimiert (Abbildung 2G). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Knochenmarkaspiraten von Patient:innen mit soliden Tumoren und Patient:innen mit MM.

Zusammengefasst wurde TIGIT signifikant häufiger mit PVRIG (bei 4 von 4 Tumorentitäten) und CD39 (bei 2 von 4 Tumorentitäten) exprimiert. Im Zusammenhang mit der Dysfunktion von CD8⁺-T-Zellen während der Tumorprogression könnten diese Expressionsmuster auf eine funktionelle Relevanz und möglicherweise auch auf synergistische Effekte der beiden Signalwege hindeuten.

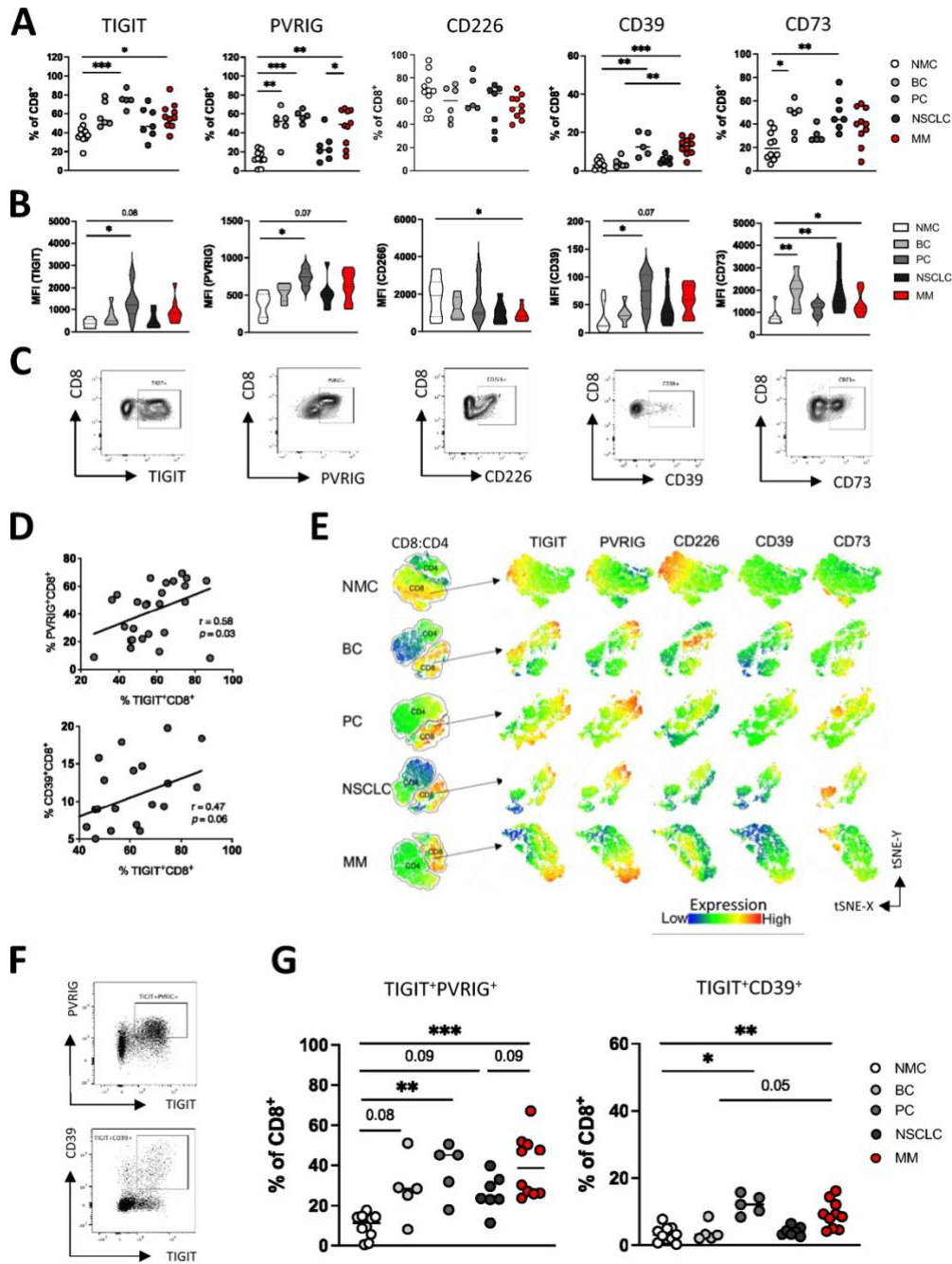


Abbildung 2

Die Expression von TIGIT, PVRIG, CD226, CD39 und CD73 wurde an CD8⁺-T-Zellen untersucht. Die multiparametrischen Durchflusszytometrie-Analysen (MFC) umfassten Knochenaspirate aus Knochenmetastasen (BM) von Patientinnen mit Brustkrebs (BC *n* = 6), Patient:innen mit Prostatakrebs (PC *n* = 5), mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC *n* = 7) und Patient:innen mit multiplem Myelom (MM *n* = 10). Die malignen Aspirate wurden mit Knochenaspiraten von altersgleichen nicht-malignen Patient:innen verglichen, die sich einer Wirbelsäulenoperation unterzogen (NMC *n* = 10). **A** Häufigkeiten der TIGIT-, PVRIG-, CD226-, CD39- und CD73-Expression auf den angegebenen CD8⁺ T-Zellen. **B** Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Proteine auf CD8⁺ T-Zellen. **C** Beispielhafte FACS-Plots. **D** Korrelation von TIGIT mit PVRIG und CD39 auf CD8⁺ T-Zellen. **E** T-verteilte stochastische Nachbar-Einbettung (tSNE)-Heatmaps veranschaulichen die Expression und Verteilung von TIGIT, PVRIG, CD226, CD39 und CD73 auf CD8⁺T-Zellen aus Aspiraten von Patient:innen mit BC, PC, NSCLC und MM (*n* = 4 jeweils). **F** Beispielhafte Flussdiagramme veranschaulichen das Ko-expressionsmuster von PVRIG und CD39 mit TIGIT auf CD8⁺ T-Zellen. **G** Ko-expression von TIGIT mit PVRIG und CD39 auf CD8⁺ T-Zellen. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001

3.3 NK-Zellsuppopulationen aus Knochenmetastasen weisen unterschiedliche Expressionsmuster von koregulatorischen Moleküle auf

Um weiter zu untersuchen, ob auch aus dem Knochenmark stammende NK-Zellen ein abnormes Checkpoint-Profil aufweisen, wurde erneut die Expression von TIGIT, PVRIG, CD226 sowie der Ektonukleotidasen CD39 und CD73 mittels MFC am jeweiligen NK-Zell-Panel analysiert. Die Expressionsanalysen erfolgten auch für die NK-Subpopulationen CD56⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺ und CD56⁻CD16⁺.

Im Vergleich zu NMC-Aspiraten wurden TIGIT⁺- und CD226⁺-NK-Zellen signifikant häufiger in den Aspiraten von Patient:innen mit BC und NSCLC nachgewiesen. PVRIG zeigte ein anderes Expressionsmuster: Neben BC-Aspiraten wiesen PC- und MM-Aspirate im Vergleich zu NMC-Aspiraten häufiger PVRIG⁺-NK-Zellen auf (Abbildung 3A). Diese Verteilungsmuster zeigten sich auch in den Analysen der medianen Fluoreszenzintensität (MFI, Abbildung 3B). Was den purinergeren Signalweg betrifft, so wurde CD39 häufiger auf den NK-Zellen von NSCLC- und MM-Aspiraten exprimiert, während CD73 im Vergleich zu NMCs hauptsächlich auf NK-Zellen von NSCLC-Aspiraten exprimiert wurde.

Hinsichtlich der funktionellen NK-Zell-Subtyp-Stratifizierung ergaben unsere Untersuchungen, dass die beiden inhibitorischen Rezeptoren TIGIT und PVRIG häufiger auf den zytotoxischen CD56⁻CD16⁺-NK-Zell-Subgruppe exprimiert wurden, während CD226 und die beiden metabolischen Enzyme CD39 und CD73 vorwiegend von den regulatorischen CD56⁺CD16⁻-NK-Zellen exprimiert wurden (Abbildung 3C). Korrelationsanalysen ergaben einen Zusammenhang zwischen der Expression von TIGIT und PVRIG auf CD56⁻CD16⁺-NK-Zellen sowie zwischen CD39 und CD73, jedoch nicht von CD226 auf CD56⁺CD16⁻-NK-Zellen (aufgrund der geringen Fallzahl wurden die malignen Kohorten hier erneut zusammengefasst, Abbildung 3D).

Anschließend wurden Ko-expressionsanalysen innerhalb der NK-Zell-Untergruppen CD56⁻CD16⁺ und CD56⁺CD16⁻ durchgeführt. Wie beispielhaft in Abbildung 3E gezeigt, wurde ein signifikantes Ko-expressionsmuster von TIGIT und PVRIG in den CD56⁻CD16⁺-NK-Zellen sowie von CD39 und CD73 innerhalb der CD56⁺CD16⁻-NK-Zell-Untergruppe festgestellt, das in mindestens 2 von 4 Tumorentitäten statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 3F).

Zusammengefasst wurden TIGIT und PVRIG hauptsächlich auf CD56⁻CD16⁺ NK-Zellen der BM-Aspirate exprimiert, während CD39 und CD73 vorwiegend von den CD56⁺CD16⁻ Zellen exprimiert wurden.

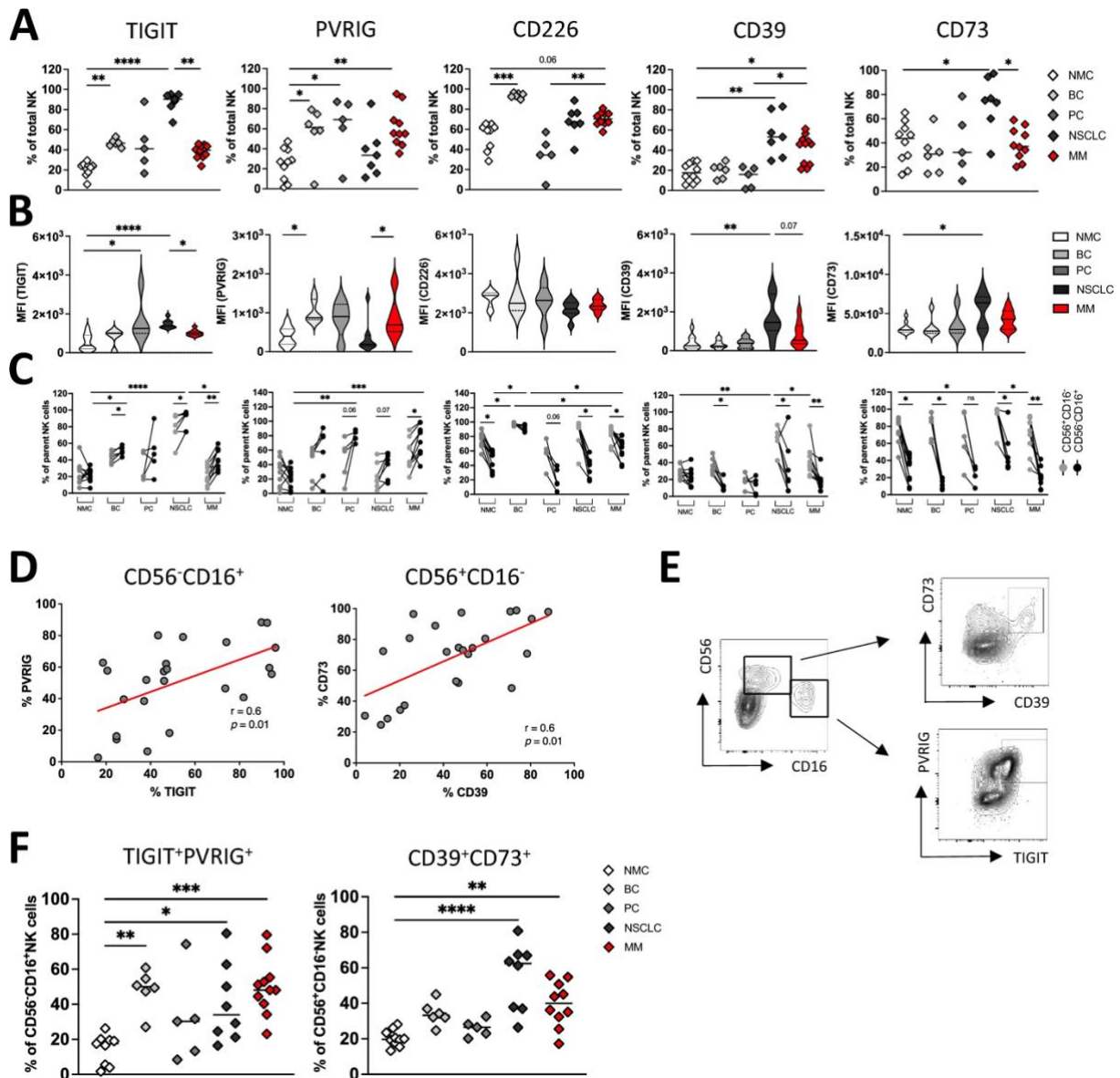


Abbildung 3

Die Proteinexpression von TIGIT, PVRIG, CD226 sowie der Ektonukleotidasen CD39 und CD73 wurde auf NK-Zellen untersucht. Dazu wurden Knochenaspirate von Patientinnen mit Brustkrebs (BC $n = 6$), Patient:innen mit Prostatakrebs (PC $n = 5$), mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC $n = 7$) und Patient:innen mit multiplem Myelom (MM $n = 10$) mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie analysiert und mit altersentsprechenden mononukleären Zellen aus Knochenaspiraten von nicht-malignen Patient:innen verglichen, die sich einer Wirbelsäulenoperation unterzogen (NMC $n = 10$). **A** Häufigkeit der Proteinexpression von TIGIT, PVRIG, CD226, CD39 und CD73 auf den angegebenen NK-Zellen. **B** Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Proteine auf den angegebenen NK-Zellen. **C** Proteinexpression auf zytotoxischen CD56⁺CD16⁺ und regulatorischen CD56⁺CD16⁻ NK-Zellen. **D** Korrelation von TIGIT mit PVRIG und von CD39 mit CD73 auf CD56⁺CD16⁺ und regulatorischen CD56⁺CD16⁻ NK-Zellen. **E** Beispielhafte Durchflussdiagramme. **F** Ko-expression der Proteine für einzelne NK-Zell-Untergruppen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.4 M2-ähnliche Makrophagen aus Knochenmetastasen ko-exprimieren signifikant häufiger TIGIT und PVRL4 oder CD112 und CD155

Neben T- und NK-Zellen wurde kürzlich entdeckt, dass auch Makrophagen Liganden und Rezeptoren von ko-inhibitorischen Kontrollpunkten, darunter TIGIT und TIM-3, exprimieren [14]. Daher analysierten wir die Expression von TIGIT und seinen Liganden CD112, CD155 und PVRL4 auf aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen. Zudem wurde die Expression der beiden Ektonukleotidasen CD39 und CD73 auf Makrophagen untersucht. Wie zuvor beschrieben, wurden die Expressionsanalysen an M0- (CD68⁺CD14⁺), M2-ähnlichen (CD163⁺CD86⁺) und M1-ähnlichen (CD163⁻CD86⁺) Makrophagen durchgeführt.

Mit Ausnahme der NSCLC-Aspirate wiesen alle Knochenmarkaspirate im Vergleich zur NMC-Kohorte einen erhöhten Anteil an TIGIT⁺CD68⁺CD14⁺-Makrophagen auf. CD112⁺- und CD155⁺-Makrophagen wurden häufiger in NSCLC-Aspiraten exprimiert, mit einem Trend auch in PC-Aspiraten, während der dritte TIGIT-Ligand, PVRL4, überwiegend von Makrophagen aus BC- und PC-Aspiraten exprimiert wurde. Was das purinerge System betrifft, so wurde CD39 in fast 100 % der Makrophagen aus den Kohorten exprimiert, mit Ausnahme der NSCLC-Aspirate. Im Gegensatz konnte keine Expression von CD73 festgestellt werden (Abbildung 4A-C). Interessanterweise wurde nur der Zielrezeptor TIGIT von Makrophagen in Aspiraten von MM-Patient:innen abnormal exprimiert. Die übrigen Marker waren mit denen in NMCs vergleichbar.

Ähnlich wie zuvor bei den NK-Zell-Subpopulationen ergaben unsere Untersuchungen auch die höchste Frequenz an Molekülen der TIGIT-Signalweg-Achse auf M2-ähnlichen Makrophagen: Im Vergleich zu M1-ähnlichen Makrophagen wurden bei den M2-ähnlichen Makrophagen signifikant häufiger TIGIT⁺-, CD112⁺-, CD155⁺- und PVRL4⁺-Zellen beobachtet (Abbildung 4D). Auch unsere Cluster-Analysen mittels tSNE zeigte das TIGIT und PVRL4 sowie CD112 und CD155 in denselben Regionen von M2-ähnlichen Makrophagen exprimiert wurden (Abbildung 4E). Die Expression von CD112- und CD155- auf M2-ähnlichen Makrophagen korrelierte dabei positiv (aufgrund der geringen Fallzahl wurden die malignen Kohorten hier zusammengefasst; Abbildung 4F). Wie durch FACS-Plots zu M2-ähnlichen Makrophagen veranschaulicht (Abbildung 4G), zeigten weitere Ko-expressionsanalysen, dass M2-ähnliche Makrophagen von Patient:innen mit BC und PC TIGIT und PVRL4 signifikant häufig ko-exprimierten, während Makrophagen von Patient:innen mit NSCLC im Vergleich zu NMCs eine höhere Ko-expression von CD112 und CD155 aufwiesen (Abbildung 4H).

Zusammenfassend exprimierten die Makrophagen aus dem Knochenmark aller drei soliden Tumoren sowie aus den MM-Läsionen jeweils zwei Zielmoleküle des TIGIT-Signalwegs signifikant häufiger auf im Vergleich zu den Frequenzen, die wir in den NMC-Aspiraten feststellten (BC: TIGIT, PVRL4; PC: TIGIT, PVRL4; NSCLC: CD112, CD155; MM: TIGIT, CD155). Interessanterweise war die Expression der Zielmoleküle auf die M2-ähnlichen Makrophagen beschränkt. Im Gegensatz zu NK- und T-Zellen konnte weder eine erhöhte Expression von CD39 und CD73 festgestellt werden.

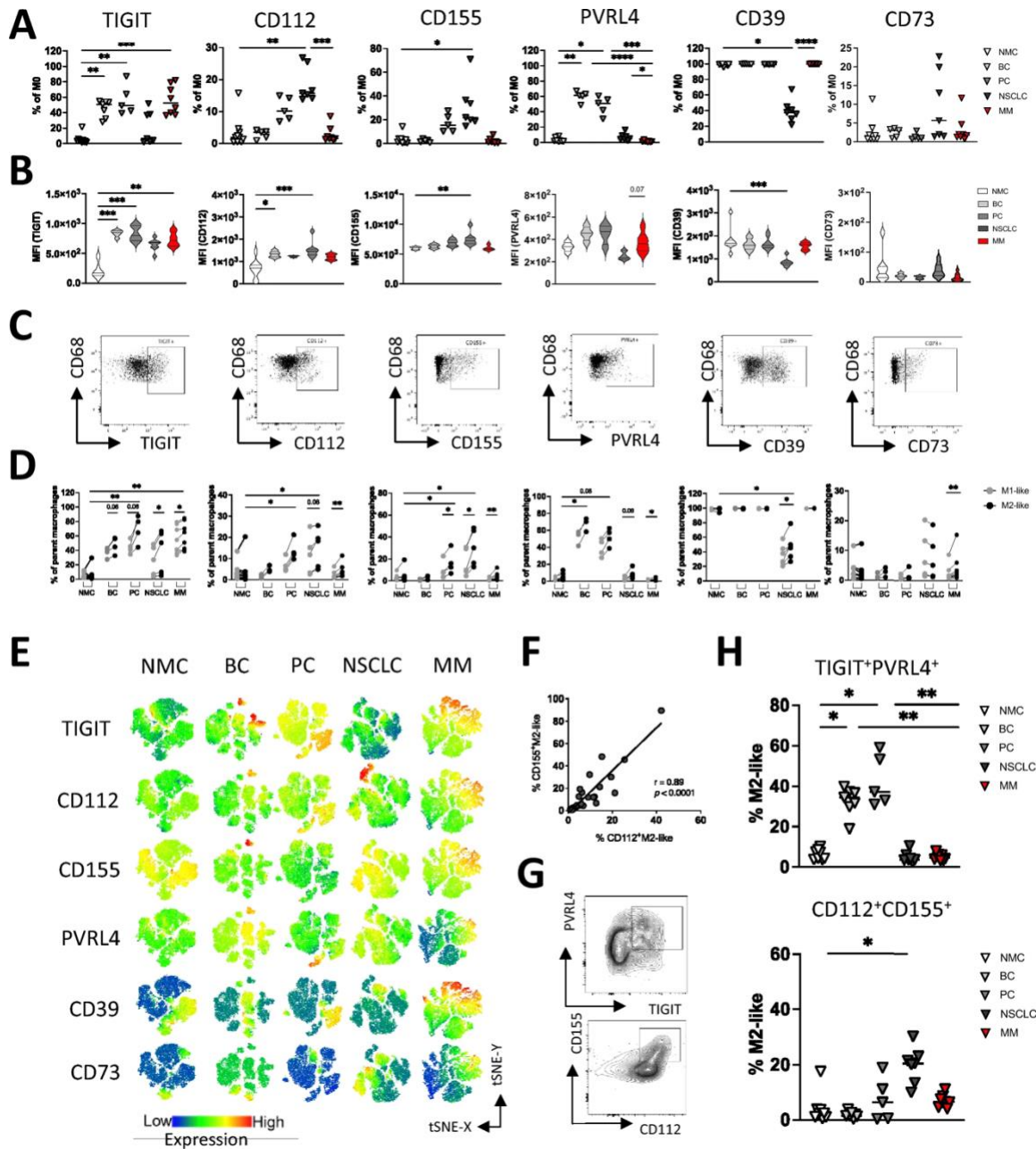


Abbildung 4

Die Expression von TIGIT, CD112, CD155, PVRL4, CD39 und CD73 auf Makrophagen wurde mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie (MFC) untersucht. Die Kohorte umfasste Knochenaspirate von Patientinnen mit Brustkrebs (BC $n = 6$), Patient:innen mit Prostatakrebs (PC $n = 5$), mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC $n = 7$) und Patient:innen mit multiplem Myelom (MM $n = 10$). Die MFC-Daten wurden mit altersentsprechenden mononukleären Zellen aus Knochenaspiraten von nicht-malignen Patient:innen verglichen, die sich einer Wirbelsäulenoperation unterzogen hatten (NMC $n = 10$). **A** Häufigkeit von TIGIT-, CD112-, CD155-, PVRL4-, CD39- und CD73-exprimierenden M0-Makrophagen. **B** Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Zielproteine auf M0-Makrophagen. **C** Flussdiagramme der Proteinexpression auf M0-Makrophagen. **D** Proteinexpression auf CD163⁺CD86⁺ M1-ähnlichen und CD163⁺CD86⁺ M2-ähnlichen Makrophagen. **E** T-verteilte stochastische Nachbar-Einbettung (tsNE)-Heatmaps der Proteinexpression auf M0-Makrophagen. **F** Korrelationsanalyse von CD112 und CD155 auf CD163⁺CD86⁺ M2-ähnlichen Makrophagen. **G** Koexpression von TIGIT mit PVRL4 und von CD112 mit CD155. **H** Aberrante Ko-expressionsmuster auf CD163⁺CD86⁺ M2-ähnlichen Makrophagen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.5 Die Blockade von TIGIT und CD39 verstärkte die Lyse von Myelomzellen in-vitro

Aufgrund ihrer aberranten Expressionsmuster untersuchten wir das therapeutische Potenzial einer Blockade von TIGIT und CD39. Dabei prüften wir den Einfluss einer solchen Blockade auf die Zytotoxizität peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs). Ziel unserer funktionellen Blockade war es, eine Steigerung der PBMC-vermittelten Lyse von Tumorzellen zu induzieren. Die funktionellen Untersuchungen wurden beispielhaft in einem Myelom-Modell durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zwei Myelomzelllinien verwendet, die CD39 in unterschiedlicher Häufigkeit exprimierten. Zudem ko-exprimierten beide Zelllinien die TIGIT-Liganden CD112 und CD155 [15].

Die alleinige Blockade des TIGIT-Rezeptors führte in vitro zu einer verstärkten CD3/CD28-stimulierten PBMC-Zytotoxizität (Abbildung 5A). Die TIGIT-Blockade führte zu einer gesteigerten PBMC-vermittelten Lyse von U266- und LP-1-Zellen nach 24 h und 72 h (Abbildung 5B). Da CD39 von den MM-Zelllinien U266 und LP-1 exprimiert wurde (Abbildung 5C), untersuchten wir darüber hinaus die funktionelle Blockade des Ektoenzym CD3. Hierzu wurde ein neu entwickelter Nanokörper eingesetzt. Details zu dem Nanokörper-Konstrukt sind der folgenden Literatur zu entnehmen [16]. Die funktionelle Bewertung der Ektonukleotidase CD39 erfordert das Substrat des Enzyms, exogenes Adenosintriphosphat (ATP). In einem Vorversuch untersuchten wir also zunächst, welche Konzentrationen von exogenem ATP selbst eine zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zellpopulationen haben. Die in vitro ATP-vermittelte Zytotoxizität auf U266-MM-Zellen und PBMCs wurde unter Verwendung von ATP-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 2000 μM analysiert. Die Untersuchung ergab sowohl für die Ziel- als auch für die Effektorpopulation, dass ATP-Konzentrationen bis zu 1000 μM zu Zytotoxizitätsraten unter 10 % führten (7AAD⁺-Zellen; Abbildung 5C). Hinsichtlich der PBMC-vermittelten Lyse von Tumorzellen zeigten die nachfolgenden Zytotoxizitätsassays, dass die Blockade von CD39 zu einer erhöhten CD3/CD28-stimulierten PBMC-vermittelten Lyse von MM-Zellen führte (Abbildung 5E-F). Die Effekte waren in der U266-Myelomzelllinie stärker ausgeprägt, was möglicherweise auf die erhöhte Frequenz an CD39-myelomzellen zurückzuführen ist. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse untersuchten wir dann die Auswirkungen einer zusätzlichen TIGIT-Blockade in Verbindung mit einer Hemmung des purinergen Signalwegs. Die kombinierte Blockade von CD39 und TIGIT erzielte eine signifikant gesteigerte MM-Zelllyse in einer von zwei Zelllinien im Vergleich zu einer einzelnen Blockade bzw. in beiden Zelllinien im Vergleich zu der Kontrollbehandlung (Abbildung 5E-F).

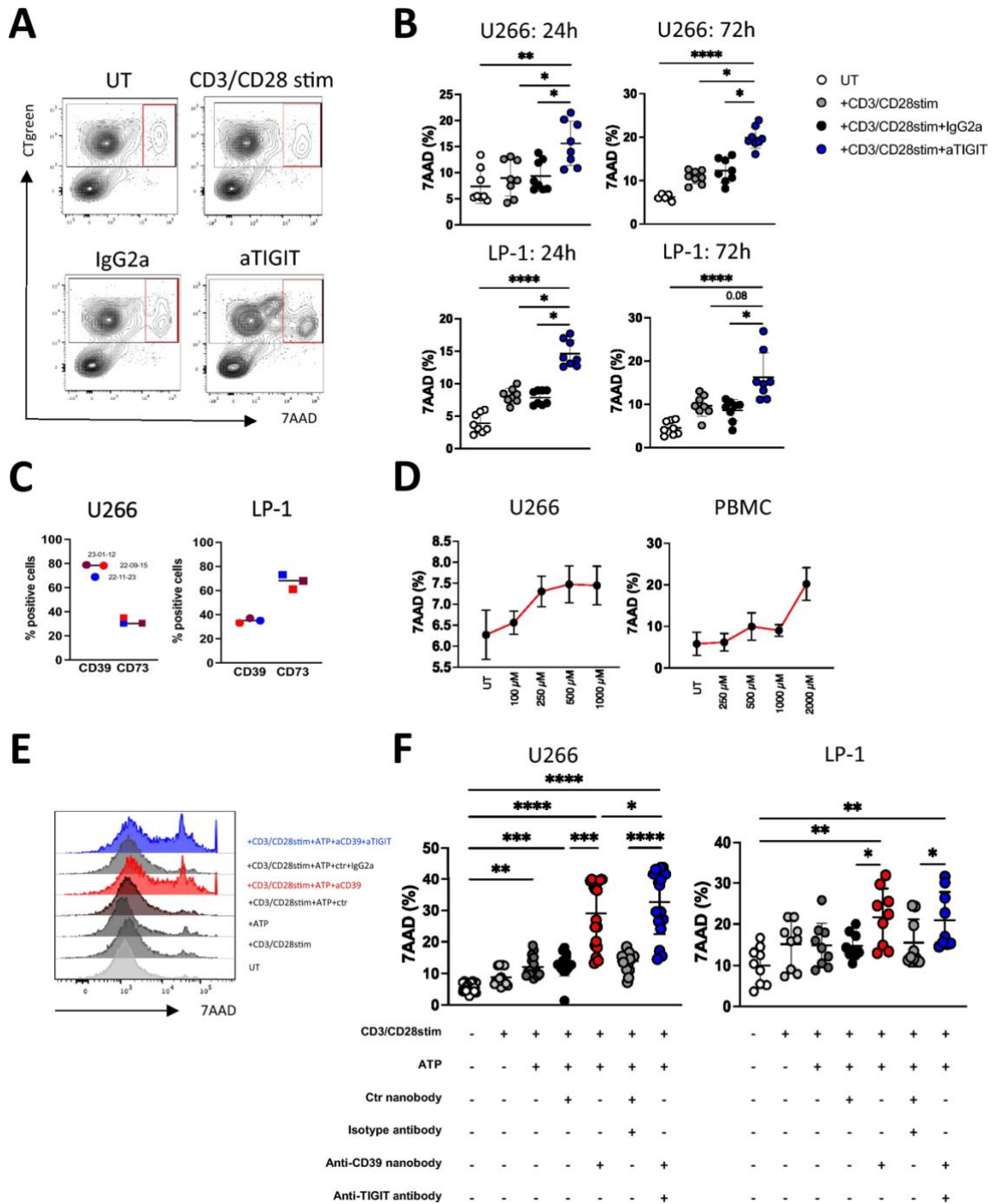


Abbildung 5

Die Blockade von TIGIT und CD39 wurde an peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) untersucht, die über 24 Stunden und 72 Stunden *in vitro* mit Myelomzellen (MM) ko-kultiviert wurden. **A** Repräsentative Durchflusszytometrie-Diagramme. **B** Auswirkungen der alleinigen TIGIT-Blockade auf die durch CD3/CD28 stimulierte PBMC-vermittelte Lyse (MM-Zelllinien U266 ($n = 3$) und LP-1 ($n = 3$)). **C** Repräsentative Häufigkeiten des Expressionsstatus von CD39 und CD73 auf U266- und LP-1-MM-Zellen. **D** Zytotoxische Wirkungen von exogenem Adenosintriphosphat (ATP) *in vitro* ($n = 3$). **E** Beispielhafte FACS-Histogramme. **F** Die Blockade von CD39 und TIGIT unter dem Einfluss von exogenem ATP auf CD3/CD28-stimulierte PBMCs wurde für U266-Zellen ($n = 5$) und LP-1-Zellen ($n = 4$) analysiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.4. Literaturverzeichnis

1. Hernandez RK, Wade SW, Reich A, Pirolli M, Liede A, Lyman GH. Incidence of bone metastases in patients with solid tumors: Analysis of oncology electronic medical records in the United States. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–11.
2. Soeharno H, Povegliano L, Choong PF. Multimodal treatment of bone metastasis - A surgical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(SEP):1–15.
3. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L, et al. Bone metastases: An overview. *Oncol Rev*. 2017;11(1).
4. Bi N, Shedden K, Zheng X, Kong FMS. Comparison of the Effectiveness of Radiofrequency Ablation With Stereotactic Body Radiation Therapy in Inoperable Stage I Non-Small Cell Lung Cancer: A Systemic Review and Pooled Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys [Internet]*. 2016;95(5):1378–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.04.016>
5. Pawlik TM. Immunotherapy for Solid Malignancies. *Surg Oncol Clin N Am [Internet]*. 2019;28(3):xiii–xiv. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.soc.2019.04.001>
6. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707–23.
7. Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1–14.
8. Zhu Y, She J, Sun R, Yan XX, Huang X, Wang P, et al. Impact of bone metastasis on prognosis in non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2024;15(November):1–16.
9. De Giglio A, Deiana C, Di Federico A. Bone-specific response according to MDA criteria predicts immunotherapy efficacy among advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Cancer Res Clin Oncol [Internet]*. 2023;149(5):1835–47. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04120-z>
10. Chen S, Lei J, Mou H, Zhang W, Jin L, Lu S, et al. Multiple influence of immune cells in the bone metastatic cancer microenvironment on tumors. *Front Immunol*. 2024;15(February):1–15.
11. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–63.
12. Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS J*. 2021;23(2).
13. Pu J, Liu T, Sharma A, Jiang L, Wei F, Ren X, et al. Advances in adoptive cellular immunotherapy and therapeutic breakthroughs in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol [Internet]*. 2024;13(1):1–29. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00576-6>
14. Mantovani A, Allavena P, Marchesi F, Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(11):799–820.
15. Liu Z, Deng L, Jia Y, Liu H, Ding K, Wang W, et al. CD155/TIGIT signalling plays a vital role in the regulation of bone marrow mesenchymal stem cell-induced natural killer-cell exhaustion in multiple myeloma. *Clin Transl Med*. 2022;12(7):1–5.
16. Menzel S, Duan Y, Hambach J, Albrecht B, Wendt-Cousin D, Winzer R, et al. Generation and characterization of antagonistic anti-human CD39 nanobodies. *Front Immunol*. 2024;15(March):1–10.

3.5 Fazit und Ausblick

Dank der Förderung durch die Hamburger Krebsgesellschaft ist es uns gelungen aufzuzeigen, dass Patient:innen mit unterschiedlichen Tumoren in ihren Knochenmetastasen im Vergleich zu Aspiraten aus gesundem Knochenmark eine Verschiebung von Immunzellen aufweisen. Der Anteil an CD8⁺-T-Zellen ist geringer, während die Infiltrationsrate von immunsuppressiven CD56⁺CD16⁻-NK-Zellen und CD163⁺CD86⁺-M2-ähnlichen Makrophagen bei allen vier Tumorentitäten signifikant erhöht ist. Bei der Analyse neuartiger immunologischer Zielmoleküle wiesen CD8⁺-T-Zellen aus Knochenmetastasen im Vergleich zu NMC eine erhöhte Frequenz an TIGIT⁺-Zellen auf die PVRIG oder CD39 ko-exprimieren. In ähnlicher Weise ko-exprimieren aus dem Knochenmark stammende NK-Zellsubpopulationen häufiger TIGIT und PVRIG. Im Gegensatz dazu konnten wir eine Ko-expression von CD39 und CD73 innerhalb der regulatorischen CD56⁺CD16⁻-NK-Zellpopulation feststellen. Auch die Immunsuppressiven M2-ähnlichen Makrophagen, aus den Aspiraten der Patient:innen mit Knochenmetastasen, wiesen signifikant häufiger TIGIT⁺-Zellen auf die PVRL4 ko-exprimierten oder CD112⁺-Zellen die CD155 ko-exprimierten. In ersten in-vitro Studien konnten wir weiter zeigen, dass eine (kombinierte) Blockade von TIGIT und CD39 zu einer erhöhten Lyse von Tumorzellen führt.

Sowohl die TIGIT-Achse als auch der purinerge Signalweg erwiesen sich somit bei diesen vier Tumorentitäten als relevant, wenn auch mit Unterschieden in den Expressionsmustern. Die kombinierte Blockade von CD39 und TIGIT könnte einen interessanten Ansatz zur Stärkung der Antitumorimmunität bei Knochenmarkmetastasen darstellen. Die Ergebnisse der durch die Förderung generierten Daten konnten kürzlich in der Fachzeitschrift *Cancer Immunology, Immunotherapy* veröffentlicht werden (Brauneck et al, 2025). Die im Rahmen der Förderung erhobenen Daten stellen darüber hinaus Vordaten für einen weiteren Projektantrag bei der DFG dar, der im Laufe der nächsten Monate finalisiert und eingereicht werden soll.

4. Unterschriften



Hamburg, den 9.2.2026

Ort, Datum, Unterschrift

)

(Dr. Franziska Brauneck