

Charakterisierung der Effekte agonistischer und antagonistischer Modulation von Immuncheckpoint-Molekülen auf die Osteoklastenbiologie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Victoria Carolin Brom

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Frank A. Schildberg
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. Matthias Bernhard Stope

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.12.12024

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Einleitung	7
1.1.1 Regulationsstörungen des Knochenstoffwechsels	7
1.1.2 Immuncheckpoint-Regulation	10
1.1.3 Regulation myeloider Zellen	13
1.1.4 Fragestellung	14
1.2 Material und Methoden	14
1.2.1 Differenzierung von Osteoklasten	14
1.2.2 Validierung der Osteoklastogenese	17
1.2.3 TRAP-Färbung	18
1.2.4 Quantitative und qualitative Analyse der Osteoklastogenese	18
1.2.5 Resorptionsaktivität der Osteoklasten	19
1.2.6 Statistische Auswertung	20
1.3 Ergebnisse	21
1.3.1 Systematische Vorgehensweise der Osteoklasten-Quantifizierung und struktureller Analyse	21
1.3.2 Durchschnittliche Größe von TRAP ⁺ Zellen	24
1.3.3 Prozentuelle Änderungen der durchschnittlichen Größe von TRAP ⁺ Zellen	27
1.3.4 Quantifizierung der Gesamtzahl von Osteoklasten	28
1.3.5 Prozentuelle Änderungen der Anzahl der Gesamt-Osteoklasten	32
1.3.6 Resorption von knochenähnlicher Substanz	33

1.3.7	Quantifizierung kleiner und großer Osteoklasten	34
1.3.8	Anteil großer Osteoklasten an Gesamt-Osteoklasten	36
1.3.9	Charakterisierung der Checkpoint-Modulatoren	38
1.4	Diskussion	39
1.4.1	PD-1	39
1.4.2	PD-L1	40
1.4.3	PD-L2	41
1.4.4	PD-1-assoziierte Moleküle	42
1.4.5	TIGIT	43
1.4.6	Tim-3	44
1.4.7	GITR	45
1.4.8	CD47	46
1.4.9	Technische Herausforderungen in der quantitativen und qualitativen Analyse von Osteoklasten	46
1.4.10	Klinische Relevanz der Immuncheckpoint-Regulation von Osteoklasten	50
1.5	Zusammenfassung	54
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	55
2.	Veröffentlichungen	72
2.1	Veröffentlichung 1	72
2.2	Veröffentlichung 2	86
3.	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
FBS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICI	Immuncheckpoint-Inhibition
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IRAEs	Immune-related Adverse Events
M-CSF	Macrophage Colony-stimulating Factor
MEM α	Minimum Essential Medium α
OB	Osteoblasten
OC	Osteoklasten
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells

PBS	Phosphate-buffered Saline
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PD-L2	Programmed Cell Death 1 Ligand 2
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROI	Region of Interest
SMI	Small Molecule Inhibitor
TGF	Transforming Growth Factor
TIGIT	T-cell Immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM Domains
Tim-3	T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing Protein-3
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Regulationsstörungen des Knochenstoffwechsels

Dysbalancen der Knochenhomöostase und daraus resultierende Erkrankungen stellen eine große Belastung für Patient*innen dar und sind gesellschaftlich von zunehmender Relevanz. In dieser Hinsicht ist noch nicht vollständig erwiesen, wodurch das Ungleichgewicht in der Regulation von Osteoblasten (OB) und Osteoklasten (OC) zustande kommt, das die verminderte Knochenqualität bedingt. Zu den Erkrankungen, die auf diesem Pathomechanismus beruhen, gehören unter anderem die Osteoporose, aseptische Lockerungen von Gelenksendoprothesen, bestimmte maligne Skeletterkrankungen sowie ossäre Metastasierung anderer Krebserkrankungen. Ihnen allen gemein sind die derzeit verbesserungswürdigen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten.

Das Krankheitsbild der Osteoporose ist durch ein erhöhtes Frakturrisiko, insbesondere der Hüfte sowie der Wirbelsäule, charakterisiert. Oftmals erfolgt in einem solchen Fall jedoch nur die Frakturversorgung und die zugrundeliegende Reduktion der Knochendichte wird nicht korrekt und/oder nicht rechtzeitig diagnostiziert (Cai et al., 2020; De Martinis et al., 2020). Darüber hinaus sind auch die therapeutischen Möglichkeiten nicht genügend. Zur Frakturprophylaxe werden Calcium und Vitamin D substituiert, dies stellt jedoch keine kausale Therapie dar. Weiterhin werden antiresorptive Pharmaka eingesetzt, die gravierende Nebenwirkungen verursachen können: Bisphosphonate und der Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) -Inhibitor Denosumab bedingen Kiefernekrosen, der Sklerostin-Inhibitor Romosozumab geht mit einem deutlich gesteigerten kardiovaskulären Risiko einher und selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren potenzieren das Vorkommen thrombembolischer Ereignisse. Osteoanabole Effekte werden sowohl über den Sklerostin-Inhibitor Romosozumab als auch über Parathormon-Analoga wie Teriparatid erreicht, letztere dürfen aufgrund des Auftretens von Osteosarkomen im Tierversuch jedoch maximal 24 Monate eingesetzt werden. Ebenso limitiert ist die Anwendung aller anderen Antiosteoporotika, mit maximal acht Jahren am längsten darf dabei noch der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator Raloxifen verwendet werden (Kim et al., 2021). Der Osteoporose liegt allerdings in etwa

90 % der Fälle ein postmenopausaler Östrogenmangel zugrunde, sodass diese Therapiezeiträume in Anbetracht der durchschnittlichen Lebenserwartung nach Eintritt der Menopause bei Weitem nicht ausreichend sind. Zuletzt ist zu bedenken, dass kaum Studien existieren, die die verschiedenen Pharmaka direkt gegenüberstellen und dadurch evidenzbasierte Empfehlungen kaum sinnvoll formuliert werden können (Apostu et al., 2018; De Martinis et al., 2020).

Ähnlich verhält es sich mit der Lockerung von Gelenksendoprothesen, bei der sich vor allem die diagnostische Differenzierung zwischen septischen und aseptischen Ursachen kompliziert gestaltet. Die septische Lockerung wird durch eine bakterielle Entzündung ausgelöst und kann antibiotisch sowie mithilfe einer Revisionsoperation behandelt werden. Der aseptischen Lockerung liegt hingegen eine Abriebpartikel-bedingte Knochenresorption zugrunde, die eine lokale Inflammation auslöst und in deren Folge Osteolysen um die Implantat-Knochen-Grenze auftreten. Therapeutisch wird ein operativer Prothesenwechsel vorgenommen, dieser stellt jedoch einerseits keinen kausalen Therapieansatz dar und ist andererseits auch mit allen erneuten peri- und postoperativen Risiken für die Patient*innen verbunden. Eine ursächliche Therapie der Dysbalance des Knochenstoffwechsels der aseptischen Endoprothesenlockerung existiert bisher noch nicht, könnte allerdings zukünftig durch eine Kombination aus spezifischer Entzündungshemmung und lokaler Inhibition der Knochenresorption erzielt werden (Cong et al., 2023; Korn et al., 2020).

Maligne Erkrankungen des Knochens lassen sich in Osteosarkome, Ewing-Sarkome sowie Chondrosarkome einteilen. Frühe Erkrankungsstadien präsentieren häufig keine charakteristischen Symptome und auch in Spätstadien ist das Beschwerdebild uneindeutig, sodass Patient*innen erst mit B-Symptomatik, Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und pathologischen Frakturen auffallen. Die Diagnosestellung wird zudem dadurch erschwert, dass die Inzidenz maligner Knochentumoren verhältnismäßig gering ist und zunächst andere Erkrankungen als Ursache der Beschwerden in Betracht gezogen werden (Ferguson und Turner, 2018). Ebenso ist das therapeutische Management knocheneigener maligner Tumore seit langem schwierig, erbringt unveränderte 5-Jahresüberlebensraten zwischen 30 % bei metastasiertem Tumorleiden und etwa 60 % bei bestmöglicher Ausgangslage sowie

konstant hohe Rezidivraten von circa 30 % (Brown et al., 2018; Thanindratarn et al., 2019; Thompson und Chintagumpala, 2012). Osteosarkome sind charakteristischerweise resistent gegenüber Radiotherapie und werden mit einem multimodalen Therapiekonzept behandelt, das die operative Entfernung des Tumors sowie neo- und adjuvante Chemotherapie beinhaltet. Dabei wird die Prognose maßgeblich durch das Ansprechen auf die Polychemotherapie bestimmt (Brown et al., 2018; Heymann et al., 2016; Riedel et al., 2009). Hochmaligne Ewing-Sarkome werden vergleichbar therapiert, jedoch kann zusätzlich zur Resektion, neo- und adjuvanten Chemotherapie auch eine Strahlentherapie vorgenommen werden (Brown et al., 2018). Bei Auftreten extrapulmonaler Metastasen verschlechtert sich das 5-Jahresüberleben drastisch auf ungefähr 20 %. Indes sind Chondrosarkome weder relevant strahlen- noch chemosensibel, sodass lediglich operative Resektionen vorgenommen werden können. Die 5-Jahresüberlebensrate ist ausgesprochen variabel in Abhängigkeit des Tumorgradings zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie des Auftretens von Lokalrezidiven in ungefähr 20 % der Fälle (Brown et al., 2018; Leddy und Holmes, 2014; Whelan und Davis, 2018).

Ossäre Metastasen sind aufgrund der steigenden Lebenserwartung durch optimierte Tumorthapien von steigender Relevanz. Sie treten besonders häufig im Rahmen primärer Mamma-, Prostata-, Lungen-, Schilddrüsen- und Nierenzellkarzinome auf und stellen derzeit einen unheilbaren Zustand dar (Ban et al., 2021; Huang et al., 2020). Die Therapie umfasst die Linderung der Symptomatik sowie die Verlängerung der verbleibenden Lebenszeit durch operative Resektion, Strahlentherapie sowie antiresorptive Pharmaka, kann aufgrund der Therapierisiken und aggressiver Nebenwirkungen jedoch nur bei klinisch stabilen Patient*innen angewandt werden (Del Conte et al., 2022; Terpos et al., 2015). Knochenmetastasen gehen mit einem erhöhten Risiko für pathologische Frakturen einher. Dies ist dadurch erklärlich, dass Tumorzellen unter anderem Interleukin (IL) -1, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF) - α , Macrophage Colony-stimulating Factor (M-CSF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ausschütten, die eine massive Knochendestruktion begünstigen (Hong et al., 2020; Liu et al., 2021; Nguyễn et al., 2021). Überdies konnten in der direkten Umgebung von Metastasen des Knochens gesteigerte Aktivitätslevel von OC nachgewiesen werden – nicht nur um osteolytische, sondern auch um osteoplastische Metastasen herum (Ban et al., 2021; Liu et al., 2021; Weilbaecher et al., 2011). Der folgende Verlust von

Knochenmatrix bedingt wiederum die Ausschüttung von Transforming Growth Factor (TGF) β , Insulin-like Growth Factor (IGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Platelet-derived Growth Factor (PDGF), die ein weiteres Tumorwachstum fördern und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (De Martinis et al., 2020; Liu et al., 2021). Dieses Sekretionsprofil und die verringerte Immunantwort auf maligne Prozesse sind Charakteristika des Teufelskreises eines sogenannten „kalten“ Tumormikromilieus, das die Metastasierung in Knochen aufrechterhält und fortschreiten lässt (Casimiro et al., 2009; Gdowski et al., 2017; Liu et al., 2021; Xiang und Gilkes, 2019; Zhu et al., 2022).

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass solche Fehlregulationen der Knochenhomöostase insbesondere auch auf osteoimmunologische Zusammenhänge zurückzuführen sind. Aktivierte T-Zellen sezernieren einerseits proinflammatorische Zytokine, darunter TNF- α , TGF- β , Interferon (IFN) γ , IL-1 und IL-6, die das entzündliche Milieu aufrechterhalten (De Martinis et al., 2020; Moseley et al., 2018; Pietschmann et al., 2016; Srivastava et al., 2018), andererseits wird durch Sekretion von RANKL auch die Osteoklastogenese gefördert (De Martinis et al., 2020; Filippini et al., 2021). Folglich gerät das konstante Remodeling des Knochens aus dem Gleichgewicht und Frakturen treten häufiger auf (De Martinis et al., 2020; Terashima und Takayanagi, 2018; Walsh et al., 2018). In dieser Hinsicht ist insbesondere auch die therapeutische Regulation von Immuncheckpoints von Relevanz, da diese eine vergleichbare inflammatorische Reaktion auslösen und mit Knochenbrüchen einhergehen kann (Cai et al., 2020; Filippini et al., 2021). Für Erkrankungen, die auf gestörtem Knochenstoffwechsel beruhen, spiegeln sich diese Zusammenhänge derzeit noch nicht im diagnostischen oder therapeutischen Management wider.

1.1.2 Immuncheckpoint-Regulation

Immuncheckpoint-Moleküle stellen bedeutende Regulatoren in zahlreichen Erkrankungen dar und die Modulation dieser Signalwege ist inzwischen in Therapiekonzepten verschiedenster maligner Erkrankungen unverzichtbar. Auf diversen Zelltypen exprimiert, funktionieren Immuncheckpoints als sekundäre Regulatoren der Immunantwort und beeinflussen die Kommunikation von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und T-Zellen im Hinblick auf die Abwehr pathogener Einflüsse (Zhang und Zheng, 2020). Hierbei kann

die Modulation der Immunantwort sowohl co-inhibitorisch als auch co-stimulatorisch erfolgen und gänzlich verschiedene Auswirkungen hervorrufen (Sharma und Allison, 2015; Wykes und Lewin, 2018).

Vorwiegend in Krebserkrankungen zeigten sich hochregulierte inhibitorische Checkpoints, sodass maligne Zellen dem Immunsystem entgehen und ein weitgehend unkontrolliertes Wachstum erfolgen kann (Liu et al., 2021). Pharmakologisch wird sich die Immunevasion von Krebszellen zu Nutze gemacht, indem Therapieansätze gegen maligne Zellen nicht wie bisher die direkte Elimination der Tumorzellen und Krankheitserreger fokussieren (Lei et al., 2021; Sacdalan und Lucero, 2021; Schildberg et al., 2016; Vivarelli et al., 2021), sondern mittels inhibitorischen Immuncheckpoint-Antikörpern die endogene Immunantwort stimuliert und folglich maligne Zellen eliminiert werden (Hoves et al., 2018; Larionova et al., 2020; Pathria et al., 2019). Insgesamt ergibt sich ein komplexes immunmodulatorisches System aus der Regulation der „Gas- und Brems-Pedale“ der Immunantwort mittels Verstärkens der Stimulation, Bestärkens der Inhibition oder Aufhebens des Jeweiligen. Insofern ist nicht nur die Aktivierung der Immunreaktion durch Stimulation der Aktivierung oder Inhibition der Herunterregulation vorstellbar, sondern umgekehrt auch die Limitierung der Immunreaktion durch Verstärkung der Hemmung sowie der Inhibition der Stimulation. Immuncheckpoint-Inhibition (ICI) im engeren Sinne bezeichnet momentan jedoch das Blockieren sekundärer immunregulatorischer Prozesse, das in einer Stimulation der Immunantwort resultiert und zunehmend in der Therapie diverser Krebserkrankungen, beispielsweise des malignen Melanoms, des klarzelligen Nierenzellkarzinoms oder Bronchialkarzinomen, angewendet wird (Bagchi et al., 2021; Burugu et al., 2018; Buzzatti et al., 2020; Liu et al., 2021; Sasidharan Nair und Elkord, 2018). Darüber hinaus existieren vielversprechende Hinweise auf die Wirksamkeit der ICI in der Therapie inflammatorischer, autoimmuner sowie parasitärer Erkrankungen, so zum Beispiel das humane Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitiden, Tuberkulose, Multiple Sklerose, Malaria, Toxoplasmose und *Helicobacter pylori* (Anderson und Anderson, 2006; Das et al., 2006; Dyck und Mills, 2017; Mcberry et al., 2014; Wykes und Lewin, 2018).

Da Immuncheckpoints in der therapeutischen Anwendung derzeit unselektiv blockiert werden und dadurch eine generelle Aktivierung des Immunsystems bedingen (Chiavenna et al., 2017), ist die Natur der damit einhergehenden Nebenwirkungen, sogenannter

Immune-related Adverse Events (IRAEs), leicht verständlich. Resultierende exzessive inflammatorische Reaktionen lösen aufgrund der systemischen Toxizität teils verheerende autoimmunologische Nebenwirkungen aus, so beispielsweise Entzündungen des gastrointestinalen und endokrinen Systems, der Leber, Lunge und Haut (Brom et al., 2022; Corsello et al., 2013; Palmieri und Carlino, 2018; Postow et al., 2018; Sabbatino et al., 2022). Inzidenz und Schwere der IRAEs variieren stark in Abhängigkeit der Erkrankung, des inhibierten Checkpoint-Moleküls, der Konzentration des eingesetzten Antikörpers und der Konstitution der Patient*innen (Corsello et al., 2013; Khair et al., 2019; Khan und Gerber, 2020; Palmieri und Carlino, 2018), mitunter ist sogar der Therapieabbruch aufgrund der gravierenden Nebenwirkungen unumgänglich (Sabbatino et al., 2022). Gravierende IRAEs können als Zeichen einer stärkeren Immunaktivierung verstanden werden und gehen überwiegend mit einer Suppression der malignen Grunderkrankung einher (Conroy und Naidoo, 2022; Coschi und Juergens, 2021), jedoch ist diesbezüglich nicht belegt, ob ein Zusammenhang zwischen IRAEs eines bestimmten Organsystems und dem Ausmaß des Therapieerfolgs besteht (Sabbatino et al., 2022). In etwa 1 % der Fälle haben die auftretenden IRAEs fatale Konsequenzen (Barrueto et al., 2020; Wang et al., 2018).

Ferner zeigten sich in der klinischen Anwendung teilweise problematische Resistenzentwicklungen der Tumorzellen gegen die inhibitorischen Checkpoint-Antikörper (Chiavenna et al., 2017). Über alle therapierten Krebserkrankungen beträgt die Erfolgsrate von ICI-Monotherapien derzeit nur etwa 20 % (Wang et al., 2022). Es wird diesbezüglich zwischen primärer ICI-Resistenz, bei der von Beginn an keine Sensibilität gegenüber der Inhibition des speziellen Checkpoints besteht, und sekundärer ICI-Resistenz unterschieden, die sich durch Krankheitsremission aufgrund einer Resistenzentwicklung während der Therapie auszeichnet (Pitt et al., 2016; Restifo et al., 2016; Sabbatino et al., 2022; Syn et al., 2017). Letztere erfahren die meisten Patient*innen im Verlauf einer Checkpoint-Therapie, nach Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1)/Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1)-Blockade tritt diese sogar in bis zu 50 % der Fälle auf (Bai et al., 2017; Barrueto et al., 2020). Erfolgreiche ICI-Monotherapien sind dabei überwiegend auf immunologisch „heiße“ Tumoren beschränkt, die vorwiegend durch T-Zell-Infiltration charakterisiert sind, wohingegen „kalte“ Tumoren sich bisher wesentlich schlechter behandelbar zeigten (Barrueto et al., 2020;

Rameshbabu et al., 2021). Trotz der verbesserungswürdigen Erfolgsraten stellt die Regulation von Immuncheckpoint-Molekülen bereits jetzt eine hochpotente Therapieoption für eine steigende Zahl von malignen Erkrankungen mit umfassender klinischer Wirksamkeit dar.

Diese Einschränkungen der therapeutischen ICI sind künftig auf zweierlei Weise optimierbar. Einerseits ist eine Verbesserung des therapeutischen Erfolgs durch Kombinationstherapien denkbar, zum Beispiel die gleichzeitige Inhibition von CTLA-4 und PD-1 bei metastasiertem malignem Melanom (Chiavenna et al., 2017), sowie andererseits durch eine Zelltyp-spezifische Checkpoint-Inhibition, die beide potentiell Nebenwirkungen minimieren und zugleich die Therapieeffizienz steigern könnten (Borggrewe et al., 2020; Cassetta und Kitamura, 2018; Gibellini et al., 2020).

1.1.3 Regulation myeloider Zellen

Zusätzlich zur Regulation der Interaktion von APZ und T-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass Immuncheckpoints auch Einfluss auf die Aktivität myeloider Zellen nehmen. Dadurch können konträre Makrophagen-Phänotypen polarisiert werden, die mit spezifischen pro- (M1) beziehungsweise anti-inflammatorischen (M2) Charakteristika einhergehen (Duan und Luo, 2021; Hou et al., 2020; Mantovani und Allavena, 2015; Winograd et al., 2015). Derzeit werden zwar weitere Einflussfaktoren auf die Makrophagen-Profile kontrovers diskutiert, nichtsdestotrotz stellt die pharmakologische Regulation des angeborenen sowie erworbenen Immunsystems durch die Polarisation von Makrophagen zu M1- oder M2-Typen vielversprechende Therapieansätze für diverse maligne, infektiöse und autoimmune Krankheitsbilder dar (Ahmed et al., 2019; Chen et al., 2019; Guerrero und Sicotte, 2020; Willingham et al., 2012). Auch auf der Ebene myeloider Zellen fallen einige der Erkrankungen nicht durch überaktive Checkpoint-Expression auf, für die ICI eine denkbare Therapieoption darstellen würde, stattdessen wurden geringere Checkpoint-Spiegel festgestellt, sodass die therapeutische Stimulation der Immuncheckpoints denkbar wäre (Ardura et al., 2019; Butler et al., 2021; Saha et al., 2017; Zhao et al., 2021).

Monozyten und Makrophagen als prominente Vertreter myeloider Zellen sind zudem von immenser Relevanz im Knochenstoffwechsel, da sie als Vorläufer der

knochenabbauenden OC fungieren. In dieser Hinsicht sind auch die pro- und anti-inflammatorischen Charakteristika der M1- und M2-Phänotypen von Relevanz für die Therapie der Osteoporose, aseptischer Lockerung von Gelenksendoprothesen sowie maligner Skeletterkrankungen (Lampiasi et al., 2016; Pereira et al., 2018; Sun, Y et al., 2021; Yao et al., 2021). Ebenso vorstellbar ist der Einsatz von Immuncheckpoint-Regulation in der Behandlung sowohl osteoplastischer als auch osteolytischer ossärer Metastasen solider Tumore, beispielsweise des malignen Melanoms, des Mamma- oder Prostata-Karzinoms (Chiavenna et al., 2017; Dougall, 2012; Kingsley et al., 2007). Anhand vielversprechender publizierter Effekte auf Zellen des mononukleären Systems wurden die folgenden Checkpoint-Regulatoren und Small Molecule Inhibitoren (SMI) für diese Studie ausgewählt: PD-1, PD-L1, Programmed Cell Death 1 Ligand 2 (PD-L2), DPPA-1 und Nivolumab als Modulatoren, die bereits klinische Anwendung finden, sowie T-cell Immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM Domains (TIGIT), T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing Protein-3 (Tim-3), Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein (GITR) und Cluster of Differentiation (CD) 47, für die zwar vielversprechende Hinweise für die Therapien diverser Erkrankungen existieren, jedoch noch nicht in der Praxis angewendet werden.

1.1.4 Fragestellung

Aus diesen Überlegungen ergaben sich folgende wesentliche Punkte für die Studie: Zunächst sollte in einem umfassenden Screening-Ansatz analysiert werden, ob und falls ja, welche Immuncheckpoint-Moleküle die Osteoklastogenese und OC-Funktion in welchem Ausmaß beeinflussen.

Ferner sollte untersucht werden, ob und sofern ja, welche der Immuncheckpoints OC überaktivieren und dadurch die Knochenhomöostase negativ regulieren könnten.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Differenzierung von Osteoklasten

Für die Analyse der Auswirkungen von Checkpoint-Molekülen auf die Osteoklastogenese wurde zunächst die Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde venöses Blut der

Spender in Lithium-Heparin-Monovetten (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) entnommen, zu gleichen Teilen mit Phosphate-buffered Saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verdünnt und vorsichtig auf das gleiche Volumen des BioColl-Trennmediums (Bio & Sell, Feucht, Deutschland) in konische 50 mL-Falcon Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach einem 25-minütigen Zentrifugationsschritt (800 g, 4 °C, Bremse aus) wurde die zellhaltige Interphase in ein neues Falcon überführt und mit 50 mL PBS verdünnt. Hiernach wurde erneut 15 Minuten lang zentrifugiert (800 g, 4 °C, Bremse an), der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet zur Entfernung des zytotoxischen Trennmediums zweimal in PBS gelöst und zentrifugiert (5 min, 230 g, 4 °C, Bremse an).

Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert, dieses bestand aus Minimum Essential Medium α (MEM α ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 20 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2 g/L 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 % L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Zellzahl wurde in Neubauer-Zählkammern bestimmt und je 500.000 PBMC pro Kulturwell der 12-Well-Ibidi-Slides (Glas-Objektträger mit ablösbaren Silikonrahmen; Ibidi, Gräfeling, Deutschland) ausplattiert. Nach erfolgter Zelladhäsion wurde am zweiten Tag die Osteoklastogenese initiiert, indem ein Austausch des Mediums durch das OC-Differenzierungsmedium erfolgte. Dieses enthielt zusätzlich zum zuvor genutzten Kulturmedium 50 ng/mL M-CSF (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland), 50 ng/mL RANKL (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) und 10 nM 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sowie jeweils einen Checkpoint-Modulator oder SMI (**Tab. 1**) zur Analyse der Auswirkungen auf die Osteoklastogenese.

Die Kultur wurde weitere 12 Tage aufrechterhalten und das OC-Differenzierungsmedium alle 48 bis 72 Stunden ausgetauscht. Weiterhin wurden die Effekte zusätzlicher Checkpoint-unbehandelter Kontroll-Induktionen analysiert. Hierfür erfolgte die Stimulation mit unspezifischen nicht-bindenden Proteinen und AK in gleicher Konzentration, die keinerlei signifikante Ergebnisse im Vergleich zur OC-Kontrollinduktion erbrachten,

sodass die Validität dieser fortwährend genutzten Kontrolle gewährleistet werden konnte (**Abb. 1**). Für die Studie existiert ein positives Ethikvotum (Aktenzeichen 283/21) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Bonn.

Tab. 1: Untersuchte Checkpoint-Moleküle (modifiziert nach Brom et al., 2023). In der Studie wurde die Differenzierung der OC unter dem Einfluss diverser Checkpoint-Regulatoren in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Hierfür wurden die folgenden Checkpoint-Moleküle von Biotechne (Minneapolis, MN, USA) verwendet. Lediglich Nivolumab wurde von Leinco Technologies, Inc. (St. Louis, MO, USA) erworben.

Checkpoint-Molekül	Konzentration
Recombinant Human PD-1 Fc Chimera Protein, CF	5 µg/mL
Human PD-1 Affinity Purified Polyclonal Ab	10 µg/mL
(D)-PPA 1	1 mg/mL
Recombinant Human PD-L1/B7-H1 Fc Chimera Protein	5 µg/mL
Human PD-L1/B7-H1 Affinity Purified Polyclonal Ab	5 µg/mL
Recombinant Human PD-L2/B7-DC His-tag Protein, CF	1 µg/mL
Human PD-L2/B7-DC Antibody	2,5 µg/mL
Recombinant Human PD-1 His Tagged Protein, CF	5 µg/mL
Nivolumab, Recombinant Human Monoclonal Antibody, Anti-Human CD279 (PD-1)	10 µg/mL
	100 µg/mL
Recombinant Human TIGIT (T103) Fc Chimera Protein, CF	1 µg/mL
Human TIGIT Antibody	2,5 µg/mL
Recombinant Human TIM-3 Fc Chimera Protein, CF	1 µg/mL
Human TIM-3 Antibody	2,5 µg/mL
Recombinant Human GITR/TNFRSF18 Fc Chimera Protein, CF	1 µg/mL
Human GITR/TNFRSF18 Antibody	2,5 µg/mL
Recombinant Human CD47 His-tag Protein, CF	1 µg/mL
Human CD47 Antibody	2,5 µg/mL

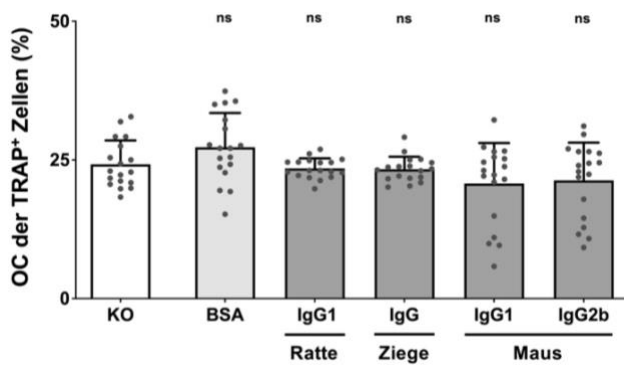


Abb. 1: Unspezifische OC-Kontrollen (modifiziert nach Brom et al., 2023). Prozentuale Anteile der Gesamt-OC an Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)+ Zellen nach Regulation mit unspezifischen irrelevanten Protein- (bovines Serum-Albumin; BSA) und Antikörper-Kontrollen (Ratte Immunglobulin (Ig) G1, Ziege IgG, Maus IgG1 und IgG2b) zur Gewährleistung der Validität der unbehandelten OC-Kontrollgruppe. Im Vergleich zu dieser OC-Kontrolle konnten keine statistisch signifikanten Effekte gemessen und somit die Zuverlässigkeit der Kontrollgruppe bestätigt werden. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren jeweils den Anteil aller OC an TRAP+ Zellen in einer Region of Interest (ROI), von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung der gemittelten Daten von zwei Spendern. KO, Kontrollgruppe, ns; statistisch nicht signifikant.

1.2.2 Validierung der Osteoklastogenese

An Differenzierungstag 14 wurde die Zellkultur beendet und zur Bestätigung der Methodik sowie Evaluierung der OC-Morphologie eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mittels 4 % Paraformaldehyd (PFA; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und anschließend mithilfe von 0,1 % Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden zudem durch 30-minütige Inkubation mit 1 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) blockiert.

Anschließend wurde zur Differenzierung der Zellen folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde über Nacht in einer feuchten Kammer ein OC-spezifischer polyklonaler anti-human Calcitonin-Rezeptor-Antikörper (Biozol, Eching, Deutschland) aufgetragen, im Anschluss erfolgte nacheinander die Inkubation mit einem rekombinanten anti-TRAP-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) für die Anfärbung von OC und OC-Vorläuferzellen sowie Phalloidin-iFluor 594 Reagenz (Abcam, Cambridge, UK) zur Markierung des Aktinskeletts. Zuletzt wurde die Kernfärbung mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vorgenommen.

Daraus ergab sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie folgende Charakterisierung der Zellen: TRAP⁺ Zellen mit weniger als drei Zellkernen wurden als OC-Vorläufer klassifiziert, wohingegen Zellen, die sowohl positiv für TRAP als auch den Calcitonin-Rezeptor waren und über mehr als drei Zellkerne verfügten, als reife OC eingeordnet wurden.

1.2.3 TRAP-Färbung

Für die Identifizierung und Quantifizierung von OC-Vorläuferzellen sowie reifen OC wurde an Tag 14 der Differenzierung eine TRAP-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die fixierten Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten lang mit einem TRAP-Puffer (destilliertes Wasser mit 6,56 g/L Natriumacetat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und 23 g/L Natriumtartratdihydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland); pH 5) inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte die zweistündige Inkubation mit der TRAP-Färbelösung, bestehend aus destilliertem Wasser mit 0,1 g/L Naphtol-Aminosäure-MX Phosphat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 10 mL/L N,N-Dimehtylformamid (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und 0,6 g/L Fast Red Violet LB Salz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle der Anfärbung, einem letzten Waschschrift und der Entfernung der Silikonkammern wurden die Deckgläser mithilfe eines wasserlöslichen Eindeckmediums aufgebracht.

1.2.4 Quantitative und qualitative Analyse der Osteoklastogenese

Zur Auswertung der Effekte der unterschiedlichen Checkpoint-Moleküle auf die Osteoklastogenese wurden zunächst mithilfe des Olympus Mikroskops IX81 und der cellSens Dimension Software (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan) alle Zellkulturwells fotografiert. Für einen Überblick über gesamte Wells wurden Fotos in 4-facher, für detaillierte Analysen in 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Zunächst wurde pro Well in jeweils sechs ROIs à 1 mm² die durchschnittliche Größe der TRAP⁺ Zellen ermittelt, indem der automatisch quantifizierte Flächeninhalt durch die gezählte Anzahl der TRAP⁺ Zellen dividiert wurde. Dies diente der initialen Untersuchung der Osteoklastogenese, da reife OC grundsätzlich größer als ihre Vorläuferzellen sind.

Weiterhin wurde manuell die Anzahl aller TRAP⁺ Zellen in denselben sechs ROIs gezählt sowie anhand der Zahl der Zellkerne gruppiert. So konnten die TRAP⁺ Zellen in OC-

Vorläufer (< 3 Zellkerne), oligo- (3 – 10 Zellkerne) und multinukleäre OC (> 10 Zellkerne) eingeteilt werden. Zusätzlich wurde die Gesamtzahl der OC (> 3 Zellkerne) pro Kulturwell festgehalten. Für unkomplizierte Gegenüberstellungen der Induktionen wurden die prozentualen Änderungen sowohl der durchschnittlichen Größe als auch der Anzahl der TRAP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollinduktion berechnet.

Ferner wurde der Anteil der multinukleären OC an den Gesamt-OC berechnet, um zu evaluieren, ob und falls ja, inwiefern eine bestimmte OC-Population die Veränderungen der OC-Gesamtzahl hauptsächlich bedingt hat.

1.2.5 Resorptionsaktivität der Osteoklasten

Zusätzlich zur quantitativen Analyse wurde die funktionelle Aktivität der OC mittels Messung der Resorptionsaktivität evaluiert. Hierfür wurden wie zuvor beschrieben PBMC isoliert, das entstandene Zellpellet in Kulturmedium zur Vordifferenzierung resuspendiert und in T-75 Zellkulturflaschen (350.000 PBMC/cm²) ausplattiert. Das Medium bestand aus MEM α mit 20 % hitzeinaktiviertem FBS, 2 g/L HEPES, 1 % L-Glutamin, 1% P/S sowie 30 ng/mL M-CSF und wurde alle 48 bis 72 Stunden gewechselt. Am siebten Tag der Vordifferenzierung konnten OC-Vorläuferzellen trypsinisiert und in spezielle 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät werden (je 30.000 Zellen pro Kulturwell). Analog zu einem bereits publizierten Protokoll sind diese Wells zuvor mit knochenähnlichem Calciumphosphat beschichtet worden (Tas und Bhaduri, 2004). Für die Differenzierung der OC-Vorläuferzellen zu reifen OC wurden dem Zellkulturmedium 60 ng/mL RANKL sowie jeweils ein zu analysierender Checkpoint-Mediator (**Tab. 1**) zugefügt. Das Differenzierungsmedium wurde alle 48 bis 72 Stunden gewechselt.

Am neunten Tag der OC-Differenzierung wurde eine von Kossa-Färbung der knochenähnlichen Calciumphosphat-Oberfläche vorgenommen. Dafür wurden zunächst alle Zellen mit 1 M Natriumhypochlorit-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation mit einer 5-prozentigen Silbernitratlösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) im Dunkeln. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen sowie zur Reduzierung der Silbersalze eine Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Im Anschluss wurde eine 5-prozentige Natriumthiosulfat-Lösung (Carl Roth,

Karlsruhe, Deutschland) zur Neutralisation aufgebracht und ein letzter Waschschrift mit Leitungswasser durchgeführt. Zuletzt wurde 100-prozentiges Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zur Entwässerung aufgetragen und die Zellkulturplatten etwa fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die verbleibende Calciumphosphat-Beschichtung erschien schwarz, wohingegen Areale mit resorbierter Beschichtung nicht angefärbt wurden.

Mithilfe des Olympus Mikroskops IX81 und der cellSens Dimension Software wurden alle Wells in 10-facher Vergrößerung vollständig fotografiert. Die verbliebene Calciumphosphat-Beschichtung wurde in sieben ROIs à 1 mm² automatisch quantifiziert und die von den entstandenen OCs lysierte Fläche berechnet.

1.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Mithilfe des D'Agostino-Pearson Tests wurde die Normalverteilung der Datensätze beurteilt und infolgedessen statistische Signifikanzen mittels einfaktorieller ANOVA-Testung berechnet. Dazu wurde das Signifikanzlevel auf $P < 0,05$ (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, **** $< 0,0001$) festgelegt.

Um zu berücksichtigen, dass OC in der Zellkultur erhebliche Variabilität, nicht nur zwischen verschiedenen Spendern und Experimenten, sondern insbesondere auch deutliche Heterogenität innerhalb einzelner Wells zeigen, wurden in jedem Well mindestens sechs ROIs ausgewertet und als unabhängige Ergebnisse gewertet. Indem diese Resultate als eigenständige Datenpunkte und nicht als technische Replikate analysiert wurden, konnte die charakteristische Streuung der Ergebnisse berücksichtigt und eine exakte statistische Auswertung gewährleistet werden. Dieses Vorgehen in der statistischen Analyse ist angelehnt an hochwertige Publikationen (Astarita et al., 2015; Lukacs-Kornek et al., 2011).

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Systematische Vorgehensweise der Osteoklasten-Quantifizierung und struktureller Analyse

In dieser Studie wurden die Auswirkungen bestimmter Immuncheckpoint-Modulatoren auf die OC-Biologie untersucht. Es wurde eine erste Gruppe von Checkpoint-Regulatoren analysiert, die bereits zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden und darunter den Knochenstoffwechsel betreffende Nebenwirkungen aufweisen. Zudem galt bereits publizierten kontrastierenden Effekten ein besonderes Augenmerk. Darüber hinaus wurde eine zweite Checkpoint-Gruppe betrachtet, die bisher keine klinische Anwendung findet, für die jedoch vielversprechende Ergebnisse publiziert wurden. Die Selektion dieser Moleküle erfolgte anhand ihrer zelltypspezifischen Effekte auf Makrophagen, die aufgrund der strukturellen sowie funktionellen Ähnlichkeit folglich OC-spezifische Wirkungen vermuten ließen.

Hierzu wurden zunächst PBMC isoliert und anschließend unter Einfluss der Checkpoint-Proteine und antagonistischen Antikörper die Osteoklastogenese induziert. Nach der Fixierung der Zellen am 14. Tag konnte eine OC-/OC-Vorläufer-spezifische TRAP-Färbung durchgeführt werden (**Abb. 2A**, **Abb. 3**, **Abb. 4**). Weiterhin wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie die Morphologie der Zelltypen analysiert, die für TRAP⁺ Zellen durch große Heterogenität in Form, Größe und Anzahl der Zellkerne charakterisiert ist (**Abb. 2B**).

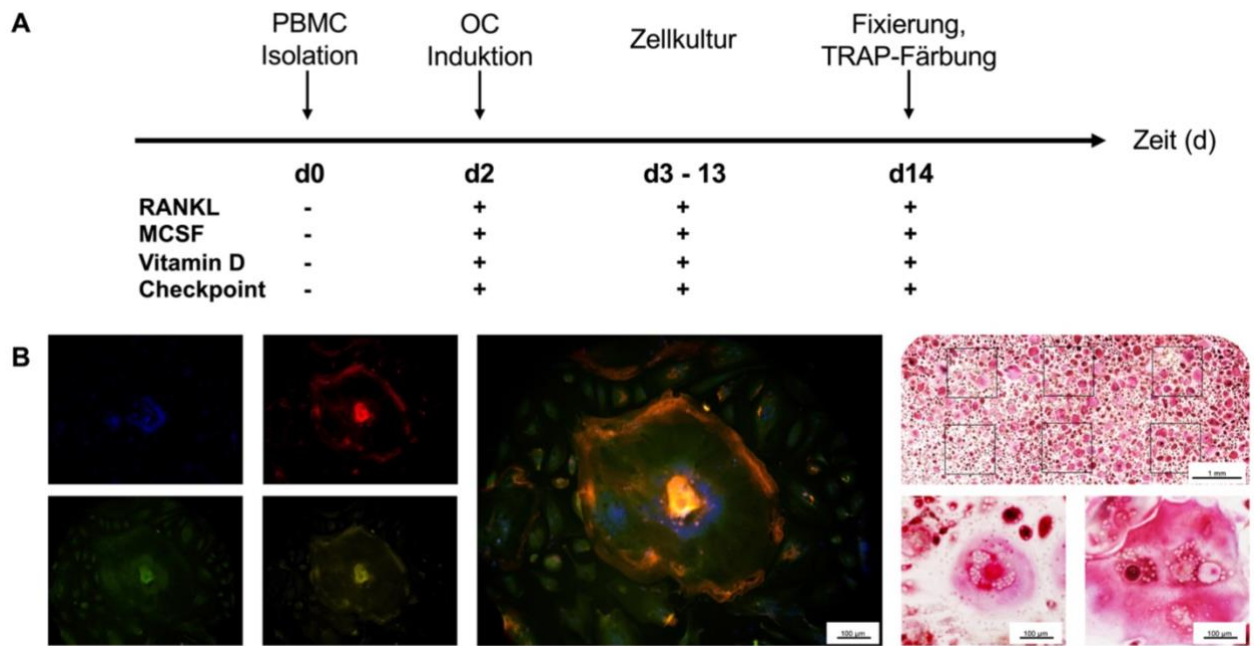


Abb. 2: Methodik der OC-Differenzierung (modifiziert nach Brom et al., 2023). (A) Visualisierung des Protokolls der Checkpoint-regulierten Differenzierung von OC. Zunächst wurden PBMC isoliert und die Osteoklastogenese durch Hinzufügen von RANKL, M-CSF, Vitamin D sowie jeweils eines Checkpoint-Moleküls induziert. An Tag 14 der Kultur wurden die Zellen fixiert, die Differenzierung von OC bestätigt und die spezifische TRAP-Färbung durchgeführt. Vitamin D, $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃; Checkpoint, Checkpoint-Regulator (Agonistisches Protein, inhibitorischer Antikörper, Small Molecule Inhibitor). (B) Fotos der Immunfluoreszenz-Färbung zur Validierung der OC-Morphologie. Hierfür wurden die folgenden Strukturen wie folgt angefärbt: Zellkerne (blau), Aktinfilamente (rot), TRAP (grün) und Calcitonin-Rezeptor (gelb). OC sind als TRAP⁺ und CalcR⁺ Zellen mit drei oder mehr Zellkernen definiert, wohingegen OC-Vorläuferzellen lediglich TRAP⁺ sind und weniger als drei Zellkerne aufweisen. Die repräsentative Aufnahme der TRAP-Färbungen zeigt ein halbes Kulturwell mit 6 ROIs (Quadrate à je 1 mm²), die zur Auswertung verwendet wurden. Zudem wird durch den Vergleich zweier Aufnahmen von OC in der gleichen Vergrößerungsstufe die gravierende Heterogenität in der Morphologie, Größe und Intensität der TRAP-Färbung von OC deutlich.

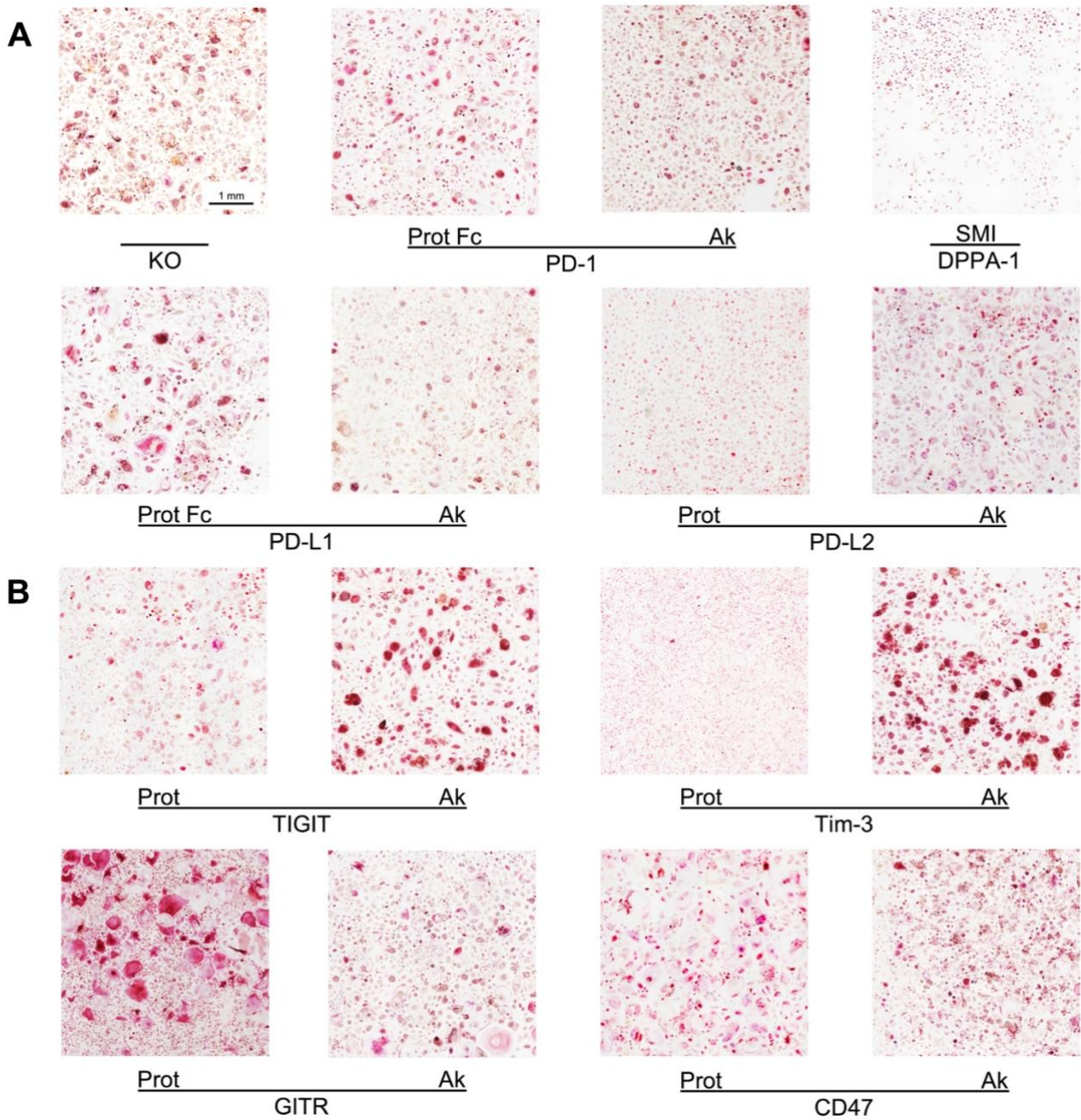


Abb. 3: Exemplarische Fotos der Checkpoint-regulierten OC (modifiziert nach Brom et al., 2023). Repräsentative Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) der OC-Differenzierung an Tag 14 der Induktion mit diversen Checkpoint-Regulatoren. (A) Gruppe der PD-1-assoziierten Modulatoren. (B) Gruppe der analysierten Checkpoint-Moleküle, die bisher nicht diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden. Prot, agonistisches Protein; Ak, inhibitorischer Antikörper.

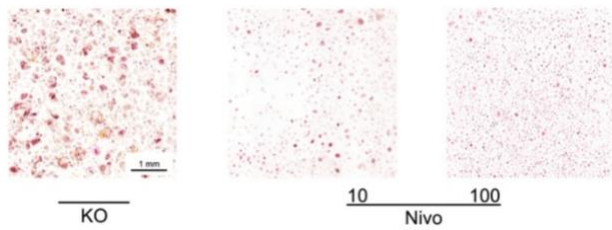


Abb. 4: Exemplarische Fotos der Checkpoint-regulierten OC (modifiziert nach Brom et al., 2023). Repräsentative Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) der OC-Differenzierung an Tag 14 der Induktion mit diversen Checkpoint-Regulatoren. Nivo, Nivolumab; 10, 10 µg/mL; 100, 100 µg/mL.

Um dennoch repräsentative und reproduzierbare Daten zu generieren, wurde eine Vielzahl einzelner Kulturwells mit Zellen verschiedener Spender in zahlreichen Replikaten analysiert. Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen der Wells in geringerer Vergrößerung sowie Detailfotos in einer höheren Vergrößerungsstufe für die Analysen der OC aufgenommen. Die quantitative Auswertung der Osteoklastogenese erfolgte manuell und ging dementsprechend mit einem erhöhten Zeit- und Arbeitsaufwand einher als andere Untersuchungsmethoden, gewährleistete jedoch mit der Untersuchung einer Vielzahl von Einzelwerten exakte Ergebnisse für die einzelnen Checkpoint-Induktionen. Ferner wurden die zur Analyse genutzten ROIs aufgrund der statistisch relevanten Streuung der Datensätze zwischen Spendern, unterschiedlichen Experimenten und besonders auch innerhalb der Kulturwells selbst, nicht als technische Replikate, sondern als unabhängige Ergebnisse gewertet, sodass eine Verzerrung der statistischen Signifikanz soweit möglich vermieden wurde.

1.3.2 Durchschnittliche Größe von TRAP⁺ Zellen

Zu Beginn der Analysen wurden die durchschnittlichen Größen von TRAP⁺ Zellen nach Induktion mit den jeweiligen Checkpoint-Regulatoren bestimmt. Hierfür wurde in mehreren ROIs pro Well der Flächeninhalt aller TRAP⁺ Zellen gemessen und durch die entsprechende Zellzahl dividiert. TRAP⁺ Zellen sind allerdings sowohl OC als auch OC-Vorläufer. Dieser Auswertung lag daher die Annahme zugrunde, dass die Zellgröße mit dem Grad der Osteoklastogenese korreliert und eine höhere Durchschnittsgröße Ausdruck einer gesteigerten OC-Differenzierung ist. Demnach konnten Änderungen der durchschnittlichen Zellgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer primären

Bewertung des Grades der Osteoklastogenese nach Applikation der Checkpoint-Moleküle herangezogen werden.

Für die Kontrollgruppe wurde eine durchschnittliche Größe der TRAP⁺ Zellen von 2669 μm^2 gemessen. Sämtliche Regulationen durch die PD-1-assoziierten Checkpoint-Mediatoren waren statistisch signifikant (**Abb. 5A**).

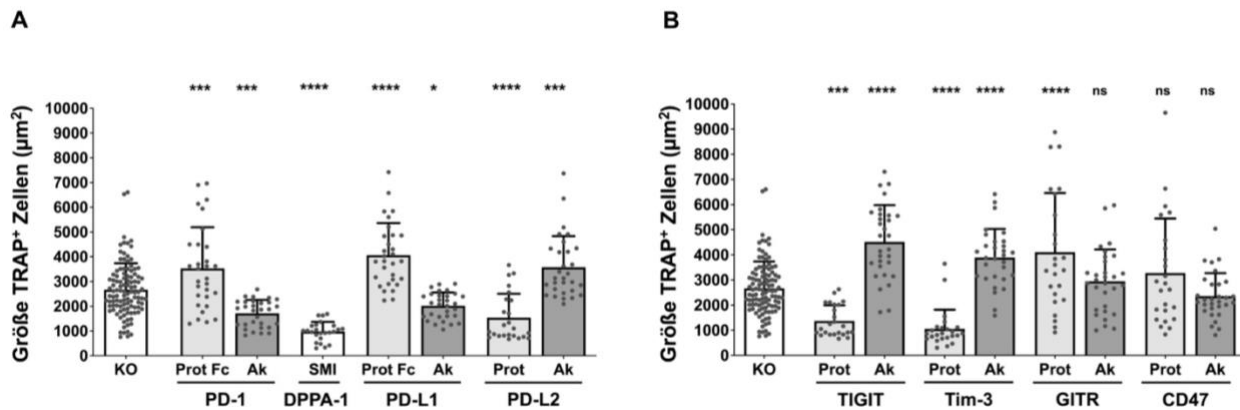


Abb. 5: Durchschnittliche TRAP⁺ Zellgröße (modifiziert nach Brom et al., 2023). Berechnete durchschnittliche Größe der TRAP⁺ Zellen in je sechs ROIs (Quadrate à 1 mm² Größe) pro Well. (A) Gruppe der PD-1-assoziierten Modulatoren. (B) Gruppe der analysierten Checkpoint-Moleküle, die bisher nicht diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren jeweils die durchschnittliche Größe der TRAP⁺ Zellen in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche Datenpunkte wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens zwei Spendern erhoben.

Die maximale Zellgröße konnte nach Applikation des PD-L1-Proteins mit 4064 μm^2 pro Zelle registriert werden. Für das PD-1-Protein sowie den antagonistischen PD-L2-Antikörper konnten vergleichbare Zunahmen der TRAP⁺ Zellgröße beobachtet werden (3532 und 3573 μm^2). Verringerte Zellgrößen resultierten aus der Induktion mit den inhibitorischen PD-1- und PD-L1-Antikörpern, dem PD-L2-Protein und DPPA-1. Eine minimale Zellgröße von lediglich 981 μm^2 resultierte nach der Behandlung mit DPPA-1. Diese initialen Ergebnisse konnten mittels Nivolumab bestätigt werden, da die Induktion mit dem Inhibitor der PD-1-PD-L1-Interaktion eine statistisch signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der Zellgröße ergab: Bei 10 $\mu\text{g/mL}$ konnten

durchschnittlich $1603 \mu\text{m}^2$, bei $100 \mu\text{g/mL}$ nur noch $1446 \mu\text{m}^2$ als durchschnittliche Größe der TRAP⁺ Zellen gemessen werden (**Abb. 6A**).

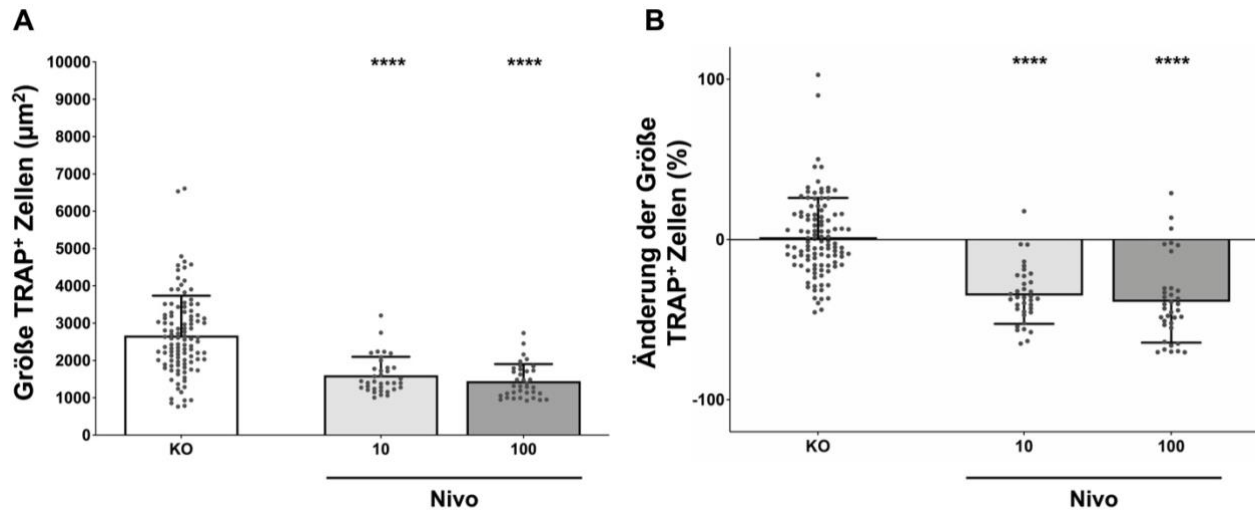


Abb. 6: Durchschnittliche TRAP⁺ Zellgröße und prozentuale Änderung (modifiziert nach Brom et al., 2023). (A) Änderung der durchschnittlichen Größe TRAP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (B) Änderung des Anteils der Gesamt-OC an TRAP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren, verglichen mit der OC-Kontrolle, jeweils (A) die durchschnittliche Änderung der TRAP⁺ Zellgröße und (B) die durchschnittliche Änderung des prozentualen Anteils der OC-Gesamtzahl an TRAP⁺ Zellen in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche Datenpunkte wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je mindestens drei Spendern erhoben.

In der Gruppe der Checkpoint-Moleküle, die bisher noch nicht in klinischem Gebrauch sind (**Abb. 5B**), zeigte sich eine statistisch signifikante maximale Zellgröße von $4516 \mu\text{m}^2$ nach Induktion mittels des inhibitorischen TIGIT-Antikörpers, dicht gefolgt von den ebenso signifikanten Ergebnissen der Stimulation mit dem GTR-Protein ($4106 \mu\text{m}^2$) und dem Tim-3-Antikörper ($3894 \mu\text{m}^2$). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Reduktion der TRAP⁺ Zellgröße nach Behandlung mit dem TIGIT- ($1369 \mu\text{m}^2$) sowie Tim-3-Protein ($1057 \mu\text{m}^2$) festgestellt werden. Keine relevanten Änderungen wurden durch Applikation der GTR- und CD47-Antikörper sowie des CD47-Proteins ausgelöst, die Zellgrößen verblieben mit $2947 \mu\text{m}^2$, $2357 \mu\text{m}^2$ sowie $3278 \mu\text{m}^2$ auf einem mit der Kontrolle vergleichbaren Niveau.

1.3.3 Prozentuelle Änderungen der durchschnittlichen Größe von TRAP⁺ Zellen

Zur Fortführung der Analyse der durchschnittlichen Größe der TRAP⁺ Zellen nach Applikation der Checkpoint-Mediatoren wurden die prozentualen Änderungen im Vergleich zur OC-Kontrollgruppe berechnet. Um eine verbesserte Übersicht und einfachere Vergleichbarkeit der verschiedenen Induktionen zu gewährleisten, wurden diese relativen Veränderungen explizit aufgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass OC grundsätzlich größer als ihre Vorläuferzellen sind, kann angenommen werden, dass die Zunahme der Zellgröße mit einem größeren OC-Anteil im Vergleich der Checkpoint-Induktionen einhergeht.

Die Stimulation der Osteoklastogenese ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,46 %) durch höhere prozentuelle Werte gekennzeichnet. Innerhalb der Gruppe von PD-1-assoziierten Checkpoint-Regulatoren (**Abb. 7A**) konnten die stärksten Zunahmen der Größe TRAP⁺ Zellen für die PD-L1- (+95,36 %) und PD-1-Proteine (+68,2 %) beobachtet werden. Reduktionen der Zellgröße registrierten wir nach Applikation von DPPA-1 (-50,83 %) und dem PD-L2-Protein (-31,85 %). Statistisch nicht-signifikante Änderungen waren für die inhibitorischen PD-1-, PD-L1- sowie PD-L2-Antikörper (-17,72 %, -2,83 %, 14,05 %) erkennbar. Ferner wurde eine deutliche Minimierung der Zellgröße TRAP⁺ Zellen nach Induktion mittels Nivolumab erkennbar, bei einer Konzentration von 10 µg/mL reduzierte sich diese um 34,95 %, bei 100 µg/mL sogar um 38,9 % (**Abb. 6B**).

Innerhalb der zweiten Checkpoint-Gruppe (**Abb. 7B**) zeigte sich die höchste prozentuale Zunahme nach Applikation des GITR-Proteins, wodurch die Zellgröße nahezu verdoppelt wurde (+95,63 %). Ebenso konnten Zunahmen sowohl durch das CD47-Protein (+62,35 %) als auch durch den inhibitorischen TIGIT-Antikörper (+41,61 %) registriert werden. Im Gegensatz dazu war die maximale Reduktion durch die Applikation des Tim-3-Proteins (-44,33 %) bedingt. Statistisch nicht-signifikante Effekte zeigten sich nach TIGIT-Protein- sowie Tim-3-, GITR- und CD47-Antikörper-Induktion (-29,86 %, +24,41 %, -8,65 %, -24,42 %).

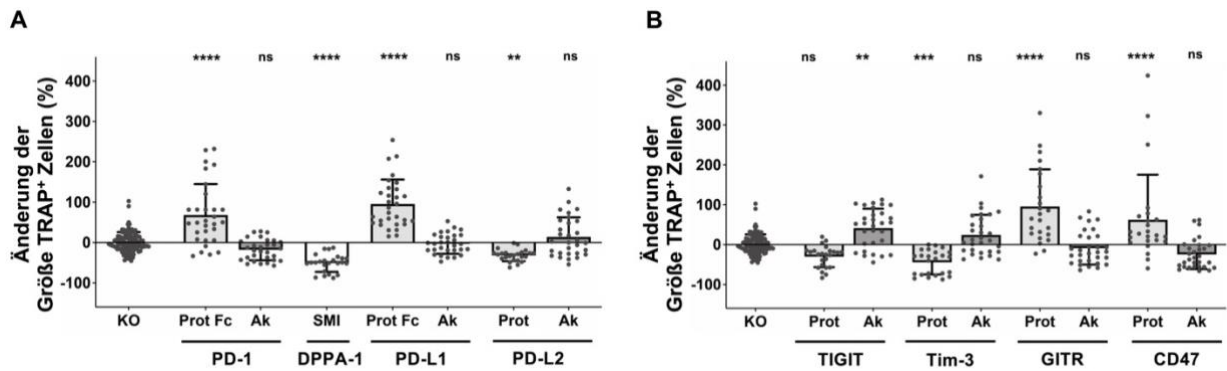


Abb. 7: Prozentuale Änderung der durchschnittlichen TRAP⁺ Zellgröße (modifiziert nach Brom et al., 2023). Änderung der durchschnittlichen Größe TRAP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (A) Gruppe der PD-1-assozierten Modulatoren. (B) Gruppe der analysierten Checkpoint-Moleküle, die bisher nicht diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren, verglichen mit der OC-Kontrolle, jeweils die durchschnittliche Änderung der TRAP⁺ Zellgröße in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche Datenpunkte wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens zwei Spendern erhoben.

1.3.4 Quantifizierung der Gesamtzahl von Osteoklasten

Entsprechend des Goldstandards der OC-Forschung wurden zusätzlich zu den vorangegangenen Analysen manuell die Gesamtzahlen der OC gezählt, um die Auswirkungen sämtlicher Checkpoint-Behandlungen exakt zu quantifizieren. Die Anteile der OC wurden als relative Prozentwerte der TRAP⁺ Zellen angegeben, um die sehr große Variabilität der Anzahl aller Zellen in den jeweiligen Wells zu berücksichtigen und keinen statistischen Bias zu generieren. In der Gruppe der PD-1-Checkpoint-Moleküle (**Abb. 8A**) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 23,71 % OC alle Effekte statistisch signifikant, teils sogar hoch-signifikant ($P < 0,0001$).

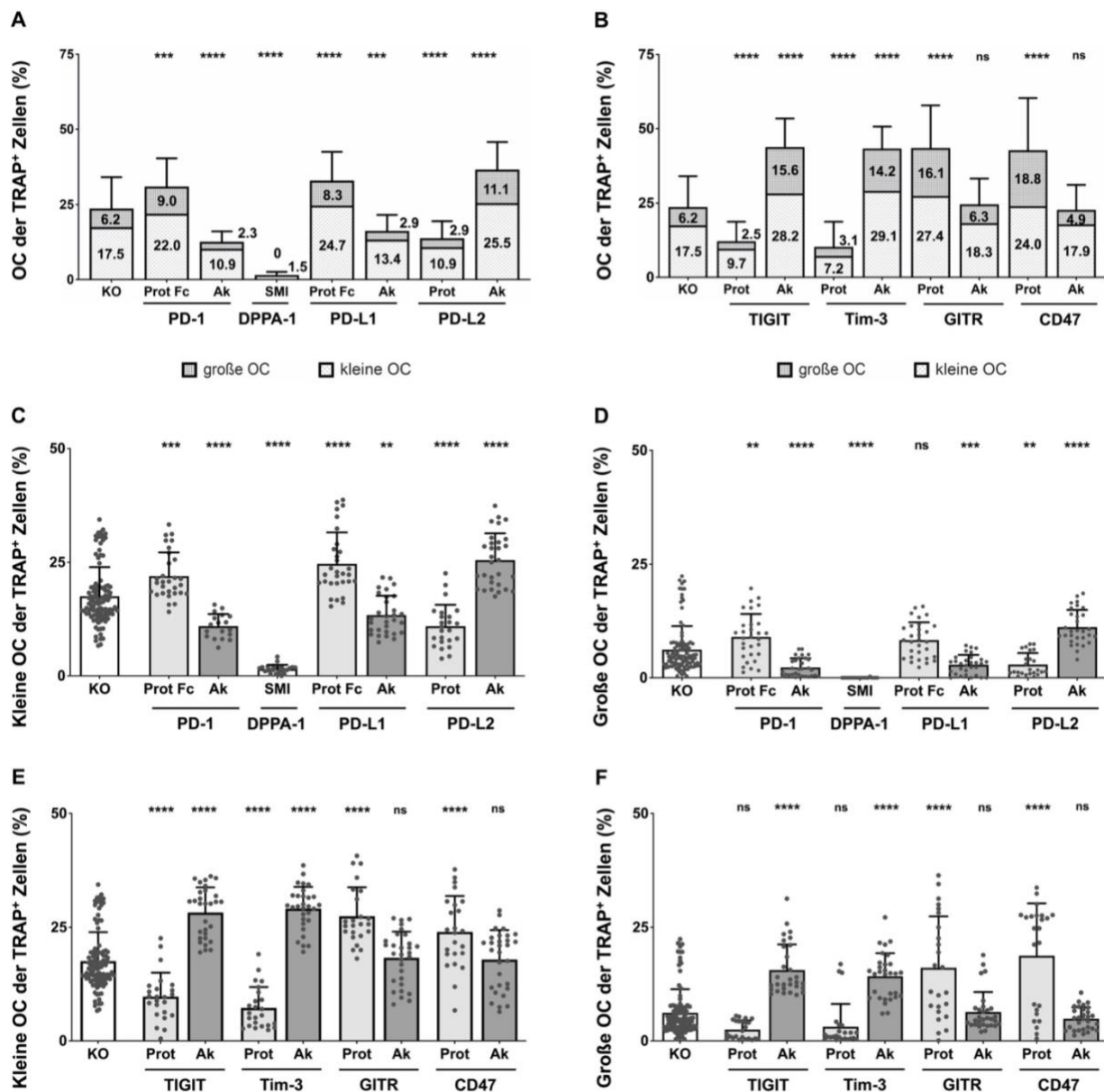


Abb. 8: Anteil der OC an TRAP⁺ Zellen (modifiziert nach Brom et al., 2023). (A, B) Prozentualer Anteil der Gesamt-OC an TRAP⁺ Zellen, gezählt in je 6 ROIs (Quadrate à 1 mm² Größe) pro Well. Die Säulen präsentieren sowohl das Verhältnis der oligo- (TRAP⁺, 3 – 10 Zellkerne) zu multinukleären OC (TRAP⁺, > 10 Zellkerne) als auch die jeweiligen Prozentwerte. Angaben zum Signifikanzniveau sowie der Standardabweichung sind für die Gesamtzahl aller OC aufgeführt. (C, E) Kleine sowie (D, F) große OC wurden in den ROIs gesondert gezählt. Die Daten zur statistischen Signifikanz und der Standardabweichung beziehen sich auf jeweils ausschließlich die kleinen beziehungsweise großen OC. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren jeweils den Anteil (A, B) aller, (C, E) der kleinen und (D, F) der großen OC an den TRAP⁺ Zellen in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* < 0,05; ** < 0,01; *** 0,001; **** < 0,0001). Sämtliche

Datenpunkte wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens zwei Spendern erhoben.

Die höchsten OC-Anteile wurden hierbei für die Behandlung mit dem inhibitorischen PD-L2-Antikörper (36,61 %), sowie den PD-L1- (32,96 %) und PD-1-Proteinen (30,97 %) beobachtet. Die Limitierung der Osteoklastogenese zeigte sich für die PD-1- (12,66 %) und PD-L1-Antikörper (16,28 %) sowie die Applikation des PD-L2-Proteins (13,83 %). Die Behandlung mit DPPA-1 resultierte dabei in minimalen OC-Anteilen von lediglich 1,53 %. Weiterhin zeigte auch Nivolumab als Inhibitor der PD-1-PD-L1-Interaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch hoch-signifikante konzentrationsabhängige Reduktionen mit 9,9 % OC bei einer Konzentration von 10 µg/mL und 5,7 % OC bei 100 µg/mL (**Abb. 9A**).

Innerhalb der zweiten Gruppe von Checkpoint-Modulatoren zeigten sich ähnlich stark signifikante Effekte auf die Gesamtzahlen von OC (**Abb. 8B**), ebenso meist mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,0001$. Die Stimulation der Osteoklastogenese konnte für die antagonistischen TIGIT- und Tim-3-Antikörper sowie die GITR- und CD47-Proteine festgestellt werden. Dabei wurde der maximale Effekt auf die OC-Zahl durch die Stimulation mittels des GITR-Proteins ausgelöst (43,51 %), dicht gefolgt sowohl von den TIGIT- (43,83 %) und Tim-3-Antikörpern (43,41 %) als auch dem CD47-Protein mit 42,73 % OC. Reduktionen der OC-Gesamtzahlen resultierten aus der Behandlung mit den inhibitorischen Tim-3- (10,35 %) und TIGIT-Proteinen (12,2 %). Statistisch nicht-signifikant waren die geringen Auswirkungen auf das Niveau der Gesamt-OC nach GITR- und CD-47-Antikörper-Induktionen mit 24,63 % und 22,75 % OC.

Insgesamt konnten durch die manuelle Zählung der Gesamt-OC die zuvor erkennbaren Trends der OC-Regulation durch die Checkpoint-Modulatoren bestätigt werden. Obwohl weder die Induktion mit dem antagonistischen GITR- noch dem CD47-Antikörper signifikante Effekte auf den Anteil der OC an TRAP⁺ Zellen zeigte, konnte zumindest eine deutliche Reduktion der Gesamt-OC im Vergleich zu den Regulationen mit den jeweils agonistischen Proteinen beobachtet werden.

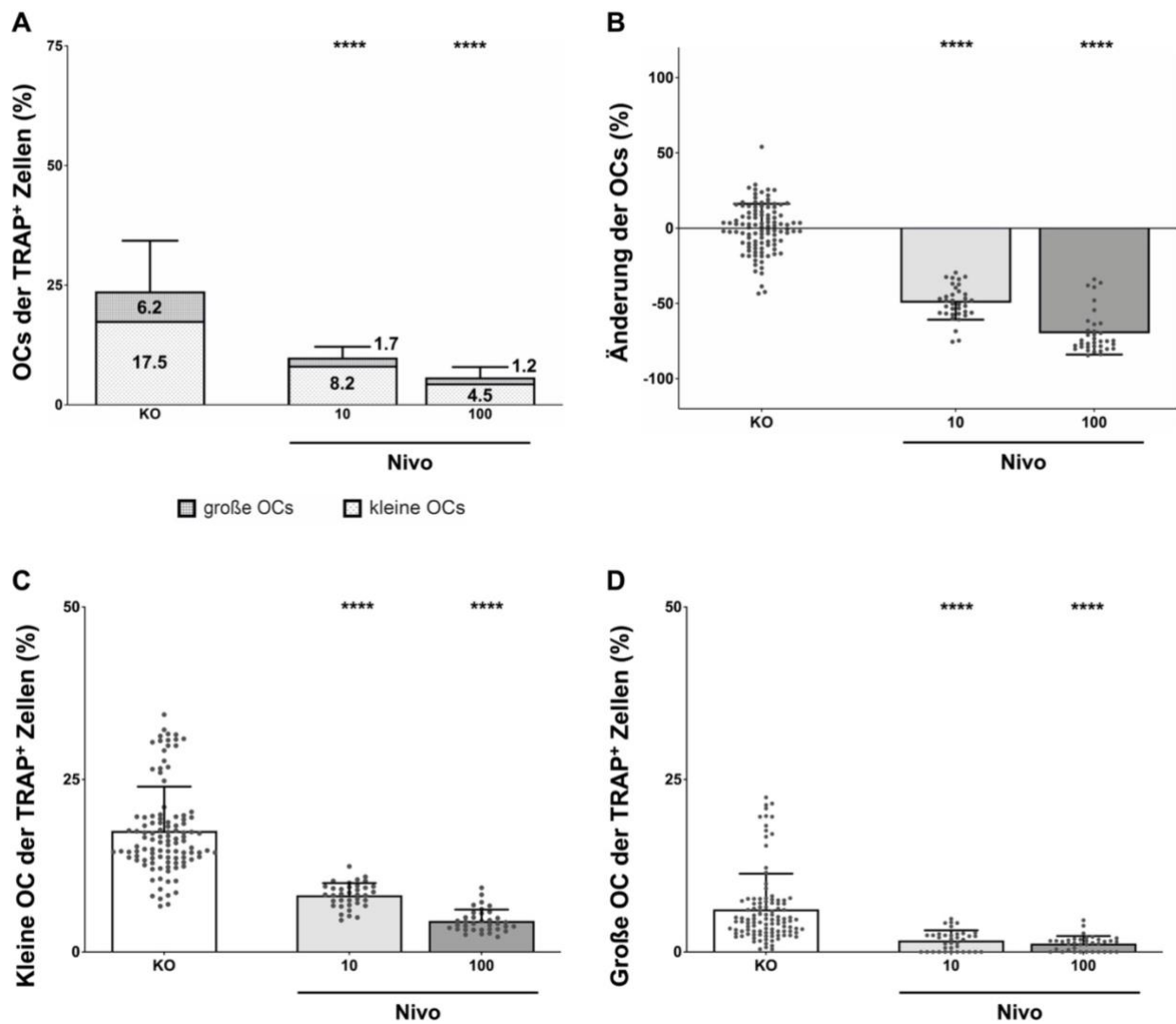


Abb. 9: Anteile der OC an TRAP⁺ Zellen und prozentuale Änderung (modifiziert nach Brom et al., 2023). (A) Prozentualer Anteil der OC an TRAP⁺ Zellen, gezählt in je 6 ROIs (Quadrate à 1 mm² Größe) pro Well. Die Säulen präsentieren sowohl das Verhältnis der oligo- (TRAP⁺, 3 – 10 Zellkerne) zu multinukleären OC (TRAP⁺, > 10 Zellkerne) als auch die jeweiligen Prozentwerte. Angaben zum Signifikanzniveau sowie der Standardabweichung sind für die Gesamtzahl aller OC aufgeführt. (B) Änderung des Anteils der Gesamt-OC an TRAP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (C) Kleine sowie (D) große OC wurden in den ROIs gesondert gezählt. Die Daten zur statistischen Signifikanz und der Standardabweichung beziehen sich auf jeweils ausschließlich die kleinen beziehungsweise großen OC. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren jeweils den Anteil (A) aller OC an TRAP⁺ Zellen, (B) ihre prozentuale Änderung verglichen mit der OC-Kontrollgruppe und den Anteil der (C) kleinen sowie (D) großen OC an den TRAP⁺ Zellen in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche Datenpunkte wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je mindestens drei Spendern erhoben.

1.3.5 Prozentuelle Änderungen der Anzahl der Gesamt-Osteoklasten

Zur verbesserten Vergleichbarkeit der erhobenen Ergebnisse für die Gesamtzahl der OC wurden die prozentualen Änderungen der einzelnen Checkpoint-Induktionen in Relation zur Kontrollgruppe (0,15 %) erhoben. Dabei wird eine Zunahme der OC-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe durch positive Prozentwerte ausgedrückt, negative Prozentwerte symbolisieren eine Reduktion der OC-Zahl. Für die Checkpoint-Regulatoren der PD-1-Gruppe (**Abb. 10A**) zeigte sich die höchste Zunahme der Gesamt-OC nach Applikation von PD-L1 (+53,43 %). Die Applikation von PD-L2 sowie von den PD-1- und PD-L1-Antikörpern resultierte jeweils in einer relativen Reduktion der OC (-40,28 %, -39,51 %, -25,03 %). Von den analysierten Regulatoren löste DPPA-1 als SMI der PD-1-PD-L1-Interaktion den maximal negativen Effekt mit -91,7 % auf die Gesamt-OC aus. Sowohl die Induktion mit dem PD-1-Antikörper als auch mit dem PD-L2-Protein haben die Zahl der OC moderat reduziert (-39,51 % und -40,28 %). Ferner konnten nach Applikation von 10 und 100 µg/mL Nivolumab als klinisch genutztem PD-1-Inhibitor ebenso deutlich signifikant verringerte OC quantifiziert werden (-49,59 % und -69,81 %, **Abb. 9B**).

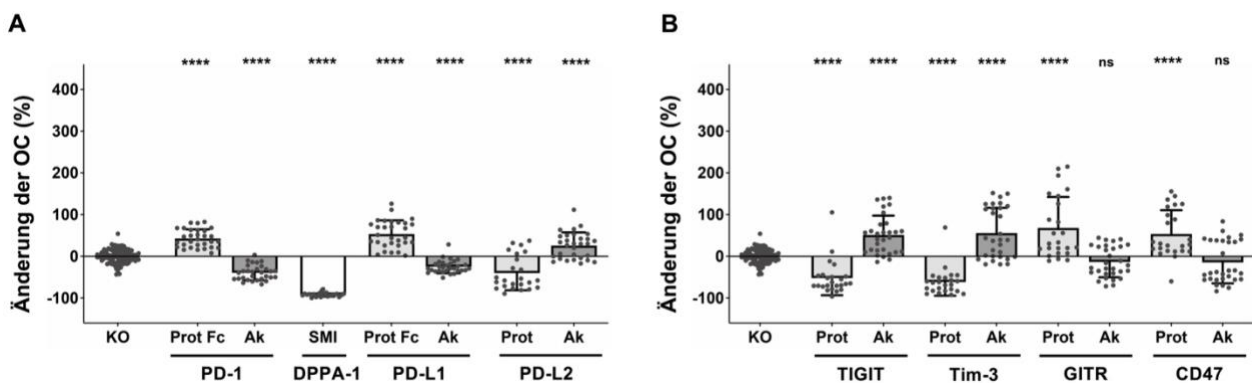


Abb. 10: Prozentuale Änderung der OC-Gesamtzahl (modifiziert nach Brom et al., 2023). Änderung des Anteils der Gesamt-OC an TRAP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (A) Gruppe der PD-1-assoziierten Modulatoren. (B) Gruppe der analysierten Checkpoint-Moleküle, die bisher nicht diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren, verglichen mit der OC-Kontrolle, jeweils die durchschnittliche Änderung des prozentualen Anteils der OC-Gesamtzahl an TRAP⁺ Zellen in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche Datenpunkte wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens zwei Spendern erhoben.

Für die zweite Gruppe der Checkpoint-Modulatoren (**Abb. 10B**) konnte die Zunahme um mindestens 50 % jeweils für die TIGIT- und Tim-3-Antikörper sowie die GITR- und CD47-Proteine registriert werden. Der größte Zuwachs der OC-Gesamtzahl zeigte sich nach der Induktion mittels des GITR-Proteins (+67,99 %). Eine Reduktion der OC um 61,59 % beziehungsweise 51,98 % wurde hingegen für die Tim-3- und TIGIT-Proteine festgestellt. Lediglich für die Regulation durch die GITR- und CD47-Antikörper konnten statistisch nicht-signifikante Limitierungen der OC registriert werden (-13,52 %, -14,62 %).

1.3.6 Resorption von knochenähnlicher Substanz

Zur Bestätigung der quantitativen Ergebnisse wurden die Auswirkungen der Checkpoint-Regulatoren auf die funktionelle OC-Aktivität untersucht. Hierzu wurde die Resorption einer knochenähnlichen Calciumphosphat-Oberfläche analysiert (**Abb. 11A**). Die Stimulation der osteoklastären Aktivität nach Checkpoint-Applikation zeigte sich durch erhöhte Resorptionsanteile und die Herunterregulierung durch geringere lysierte Oberflächenanteile, jeweils im Vergleich zur OC-Kontrollgruppe, in der durchschnittlich 46,57 % lysierte Oberfläche beobachtet werden konnte. Für die PD-1-Checkpoint-Gruppe (**Abb. 11B**) konnte die maximale Resorption mit 90,23 % für das PD-L1-Protein gemessen werden, wohingegen eine signifikante niedrigere OC-Funktion durch den PD-1-Antikörper (20 %) erreicht wurde. Die am stärksten dezimierte Resorptionsaktivität resultierte aus der Applikation von DPPA-1 (0,04 % lysierte Beschichtung). Weitere statistisch nicht-signifikante Effekte wurden nach Induktion mit den PD-1- und PD-L2-Proteinen, sowie den PD-L1- und PD-L2-Antikörpern gemessen. Für letzteren ist jedoch bei 70,81 % lysierter Oberfläche ein grundsätzlicher Trend zur OC-Stimulation erkennbar.

In der zweiten Checkpoint-Gruppe (**Abb. 11C**) wurden signifikante Zunahmen der OC-Resorptionsaktivität für die TIGIT- und Tim-3-Antikörper mit 76,85 % und 75,89 % Resorption der knochenähnlichen Beschichtung beobachtet. Eine signifikante Herunterregulation der OC-Funktion erfolgte durch Applikation des GITR-Antikörpers (18,41 %). Für den CD47-Antikörper sowie alle Induktionen mit Checkpoint-Proteinen dieser Gruppe konnten keine statistisch signifikanten Effekte nachgewiesen werden.

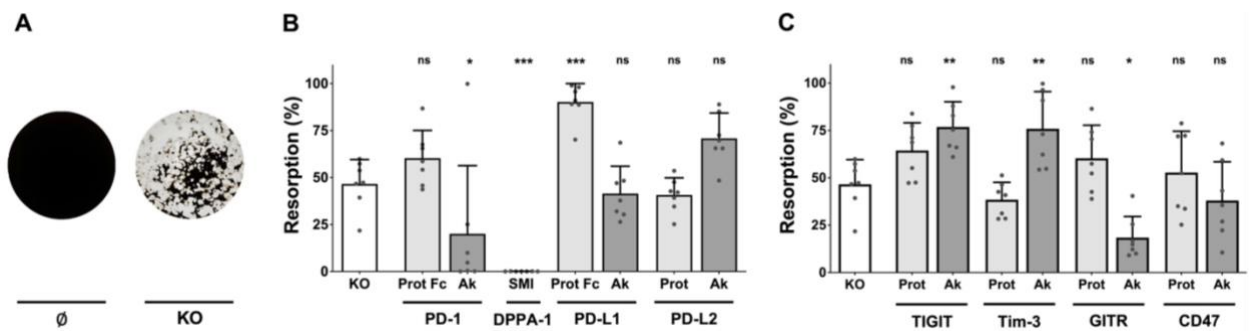


Abb. 11: Lyse knochenähnlicher Calciumphosphat-Beschichtung (modifiziert nach Brom et al., 2023). Zur Analyse der qualitativen OC-Funktion wurde die Lysierungsaktivität nach Induktion mit den Checkpoint-Molekülen während der Osteoklastogenese gemessen. (A) Vergleich exemplarischer Fotos der von Kossa-gefärbten knochenähnlichen Beschichtung in 10-facher Vergrößerung ohne Behandlung (ø) und nach 9-tägiger Inkubation mit dem OC-Differenzierungsmedium (KO). Nicht-resorbiertes knochenähnliches Material zeigt sich schwarz angefärbt, wohingegen lysierte Anteile in der Calciumphosphat-Beschichtung ungefärbt weiß bleiben. Prozentuale Anteile lysierter Beschichtung der (B) Gruppe der PD-1-assoziierten Modulatoren sowie der (C) Gruppe der analysierten Checkpoint-Moleküle, die bisher nicht diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden, wurden in sieben ROIs pro Well untersucht. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$). Gezeigt sind die Daten eines von zwei repräsentativen Spendern.

1.3.7 Quantifizierung kleiner und großer Osteoklasten

Zur Bestätigung der zuvor erfolgten Analysen wurden zusätzlich jeweils die Gesamtzahlen der kleinen sowie großen OC bestimmt. Angelehnt an die im Feld der OC-Forschung vertretene Einteilung, sind dabei in unserer Studie kleine OC als TRAP⁺ Zellen mit drei bis zehn Zellkernen und große OC als TRAP⁺ Zellen mit zehn oder mehr Zellkernen definiert. Diese Unterteilung erlaubt anschließend eine objektive Aussage darüber, ob und wenn ja, durch welchen der beiden OC-Untertypen die Regulation der Osteoklastogenese maßgeblich getragen wird.

In der Kontrollgruppe wurden von den TRAP⁺ Zellen 17,54 % kleine OC und 6,17 % große OC gezählt. Für die Checkpoint-Regulatoren des PD-1-Signalwegs (**Abb. 8C, D**) konnte die Tendenz der Gesamt-OC größtenteils auf die kleinen sowie großen OC übertragen werden. Hinsichtlich der kleinen OC (**Abb. 8C**) wurde das Maximum nach Applikation des inhibitorischen PD-L2-Antikörpers mit 25,49 % der TRAP⁺ Zellen erreicht. Für das PD-L1- und PD-1-Protein wurden ähnliche Werte detektiert (24,67 % und 21,98 %). Negative

Auswirkungen auf den Anteil der kleinen OC an den TRAP⁺ Zellen wurden nach Induktion mittels der antagonistischen PD-1- und PD-L1-Antikörper, dem PD-L2-Protein (10,92 %, 13,39 %, 10,91 %) sowie das Minimum nach DPPA-1-Applikation mit lediglich 1,51 % kleinen OC beobachtet. Hinsichtlich des Anteils der großen OC an der Gesamtzellzahl (**Abb. 8D**) konnten grundsätzlich ähnliche Effekte detektiert werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden maximale Anteile der großen OC durch den blockierenden PD-L2-Antikörper (11,12 %) und das PD-1-Protein (8,99 %) ausgelöst. Geringere Level der multinukleären OC wurden jeweils nach PD-1- und PD-L1-Antikörper- sowie PD-L2-Protein-Induktion (2,27 %, 2,88 %, 2,92 %) festgestellt, jedoch insbesondere nach der Behandlung mit DPPA-1 mit nur 0,01 % großen OC der Gesamtzellzahl. Nivolumab als PD-1-Inhibitor zeigte ebenso eine konzentrationsabhängige statistisch signifikante Reduktion mit einem Anteil der kleinen OC von 8,21 % bei 10 µg/mL und 4,5 % bei 100 µg/mL (**Abb. 9C**). Hochsignifikant war zudem die Reduktion der großen OC auf 1,66 % bei 10 µg/mL und 1,22 % bei 100 µg/mL Nivolumab in der Kultur (**Abb. 9D**).

In der zweiten Gruppe der Checkpoint-Mediatoren (**Abb. 8E, F**) bestätigte sich ebenso der zuvor beobachtete Trend der OC-Gesamtzahl. Positiv beeinflusst wurde der Anteil der kleinen OC an den TRAP⁺ Zellen (**Abb. 8E**) nach Induktion mittels der inhibitorischen TIGIT- und Tim-3-Antikörper sowie den GITR- und CD47-Proteinen (28,24 %, 29,12 %, 27,43 %, 24 %). Mit 29,12 % wurde der maximale Anteil kleiner OC nach Applikation des Tim-3-Antikörpers, der minimale Anteil mit 7,24 % nach Stimulation mit dem korrespondierenden Protein beobachtet. Statistisch nicht-signifikante Änderungen zeigten sich nach Regulation der Osteoklastogenese durch die inhibitorischen GITR- und CD47-Antikörper, die entgegen der vorherigen Beobachtungen lediglich leichte Zunahmen der kleinen OC auf 18,29 % beziehungsweise 17,89 % bewirkt haben. Relevante Stimulationen des Anteils der großen OC (**Abb. 8F**) wurden hingegen durch die Regulation mittels der TIGIT- und Tim-3-Antikörper sowie der GITR- und CD47-Proteine ausgelöst, mit einer maximalen Zunahme auf 18,73 % nach Applikation des CD47-Proteins. Im Gegensatz dazu wurde durch TIGIT-Protein-Regulation eine statistisch nicht-signifikante Reduktion der großen OC auf 2,48 % der Gesamtzellzahl bewirkt.

1.3.8 Anteil großer Osteoklasten an Gesamt-Osteoklasten

Um die Analyse der Auswirkungen von Checkpoint-Regulatoren auf die Osteoklastogenese final abzuschließen, wurden die prozentualen Anteile der großen OC an der OC-Gesamtzahl berechnet. Diese ermöglichen einen einfachen Vergleich der Anteile großer OC und können zur Beurteilung herangezogen werden, ob oligo- oder multinukleäre OC besonders stark durch Checkpoint-Modulatoren beeinflusst werden. Verglichen mit der Kontrollgruppe, in der 18,69 % aller OC mehr als drei Zellkerne aufwiesen, konnte in der PD-1-Checkpoint-Gruppe (**Abb. 12A**) der statistisch signifikante höchste Anteil großer OC für die Induktion mit dem antagonistischen PD-L2-Antikörper (22,91 %) registriert werden. Im Gegensatz dazu wurde der niedrigste Prozentsatz großer OC an Gesamt-OC nach der Applikation von DPPA-1 (0,77 %) gezeigt. Für die inhibitorischen PD-L1- (13,76 %) sowie PD-1-Antikörper (13,24 %) wurden ebenso geringere Prozentsätze großer OC im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Statistisch nicht-signifikante Änderungen wurden für die PD-1-, PD-L1- sowie PD-L2-Proteine (20,9 %, 19,25 %, 15,52 %) gemessen.

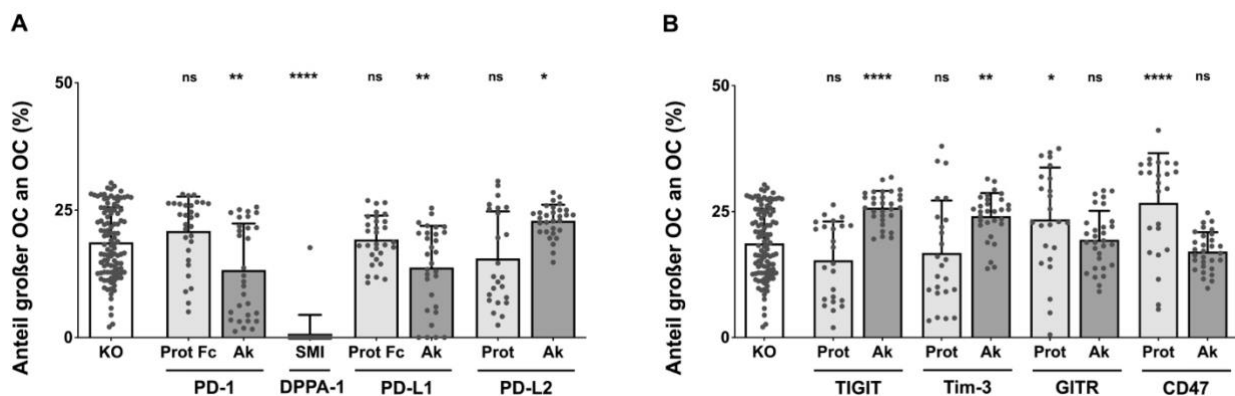


Abb. 12: Anteil der großen OC an der OC-Gesamtzahl (modifiziert nach Brom et al., 2023). Multinukleäre OC stellen einen signifikanten Anteil der Gesamtzahl von OC dar. Jedoch belaufen sich die Proportionen aller Induktionen auf deutlich unter 50 %, sodass geschlossen werden konnte, dass Änderungen der OC-Gesamtzahl im Wesentlichen durch Regulation der Anteile oligonukleärer OC getragen wurden. (A) Gruppe der PD-1-assozierten Modulatoren. (B) Gruppe der analysierten Checkpoint-Moleküle, die bisher nicht diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren jeweils den prozentualen Anteil der großen OC an der OC-Gesamtzahl in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche

Datenpunkte wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens zwei Spendern erhoben.

Nach Induktion der Osteoklastogenese mit dem PD-1-Inhibitor Nivolumab konnte ein Anteil von 12,33 % großer OC bei einer Konzentration von 10 µg/mL beziehungsweise 15,47 % großer OC bei 100 µg/mL Nivolumab gemessen werden (**Abb. 13**).

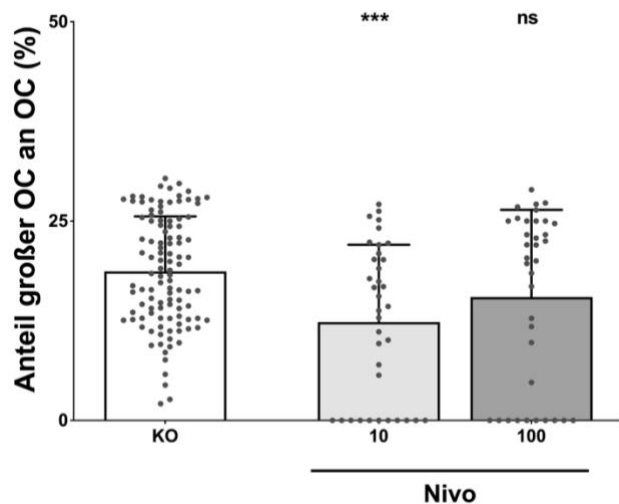


Abb. 13: Anteil der großen OC an der OC-Gesamtzahl (modifiziert nach Brom et al., 2023). Multinukleäre OC stellen einen signifikanten Anteil der Gesamtzahl von OC dar. Jedoch belaufen sich die Proportionen aller Induktionen auf deutlich unter 50 %, sodass geschlossen werden konnte, dass Änderungen der OC-Gesamtzahl im Wesentlichen durch Regulation der Anteile oligonukleärer OC getragen wurden. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren jeweils den prozentualen Anteil der großen OC an der OC-Gesamtzahl in einem ROI, von denen sechs pro Well untersucht wurden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel inklusive der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe wird durch die Anzahl der Sternchen angegeben und ist festgelegt als $P < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $0,001$; **** $< 0,0001$). Sämtliche Datenpunkte wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je mindestens drei Spendern erhoben.

Für die Regulatoren der zweiten Checkpoint-Gruppe (**Abb. 12B**) zeigten sich statistisch signifikante, maximale Anteile der großen OC an den Gesamt-OC nach Induktion mit dem CD47-Protein (26,74 %), dem TIGIT-Antikörper (25,77 %) sowie dem GITR-Protein (23,44 %). Nicht-signifikant waren hingegen die Ergebnisse der Anteile multinukleärer OC für die TIGIT- (15,35 %) und Tim-3-Proteine (16,79 %) sowie GITR- (19,41 %) und CD-47-Antikörper (17,07 %).

Grundsätzlich konnten, wie anhand der vorangegangenen Ergebnisse zu vermuten war, sowohl für die oligo- als auch multinukleären OC in vielen Checkpoint-Induktionen

vergleichbare Änderungen beobachtet werden. Für jede der analysierten Checkpoint-Regulationen zeigte sich jedoch, dass OC mit mehr als drei Zellkernen die deutliche Minderheit ausmachten. Demnach lässt sich schließen, dass Abweichungen in der Gesamtzahl von OC maßgeblich durch Alterationen der kleinen OC getragen wurden.

1.3.9 Charakterisierung der Checkpoint-Modulatoren

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auswirkungen der jeweiligen Checkpoint-Moleküle auf die Osteoklastogenese über alle Analysen hinweg übereinstimmend waren. Sowohl die Ergebnisse der durchschnittlichen Größe von TRAP⁺ Zellen als auch der qualitativen OC-Aktivität und der OC-Zählung konnten bestätigen, dass die Osteoklastogenese mittels Checkpoint-Proteinen, -Antikörpern und SMI beeinflusst werden kann. Darüber hinaus konnten die analysierten Moleküle sogar in zwei Gruppen mit kontrastierenden Auswirkungen auf die Osteoklastogenese eingeteilt werden (**Abb. 14**).

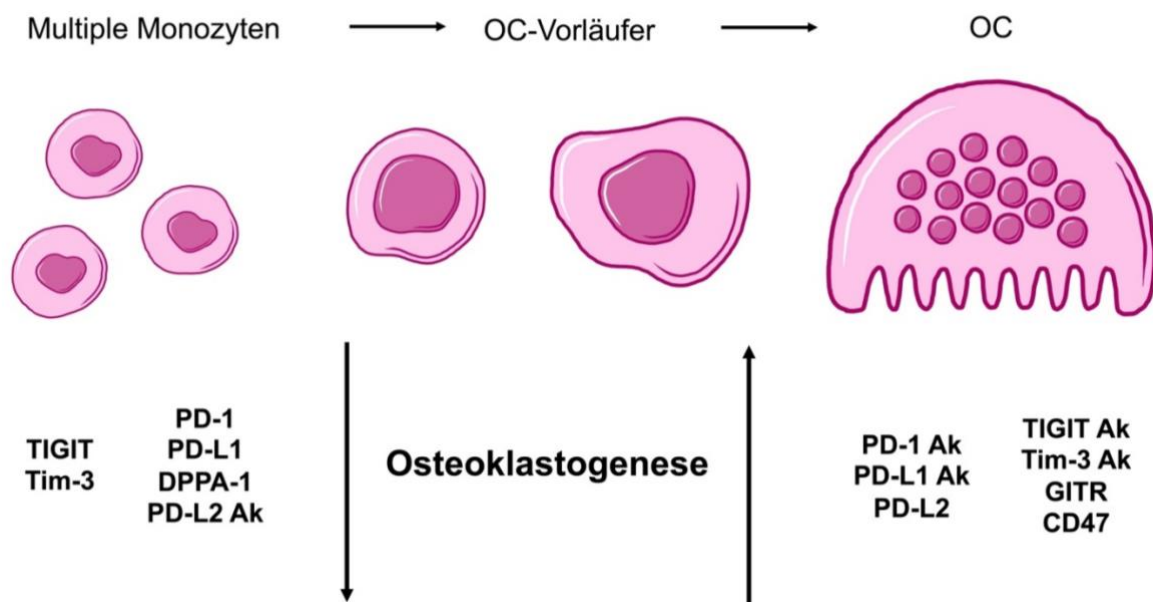


Abb. 14: Zusammenfassender Cartoon der Checkpoint-induzierten Effekte auf die Osteoklastogenese (modifiziert nach Brom et al., 2023). Überblick über die Effekte aller analysierten Immuncheckpoint-Regulatoren auf die Differenzierung von OC. In der Osteoklastogenese entwickeln sich PBMC über OC-Vorläuferzellen zu reifen OC. In unserer Studie können die Checkpoint-Modulatoren anhand ihrer spezifischen Auswirkungen auf OC in zwei Gruppen eingeteilt werden. Negative Effekte auf die Osteoklastogenese und damit einen größeren Anteil an Monozyten und OC-Vorläuferzellen werden durch die TIGIT-, Tim-3-, PD-1- und PD-L1-Proteine sowie DPPA-1 und den antagonistischen PD-L2-Antikörper ausgelöst. Im Gegensatz dazu wird die

Differenzierung von reifen OC sowohl durch inhibitorische PD-1-, PD-L1-, TIGIT- und Tim-3-Antikörper als auch durch agonistische PD-L2-, GITR- und CD47-Proteine gefördert.

1.4 Diskussion

Die untersuchten Checkpoint-Moleküle konnten anhand der Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analysen in zwei Gruppen eingeteilt werden. OC-stimulatorische Effekte konnten für PD-1, PD-L1, GITR sowie CD47 nachgewiesen werden, wohingegen PD-L2, DPPA-1, TIGIT und Tim-3 inhibitorisch auf die Osteoklastogenese wirkten. Die jeweils korrespondierenden inhibitorischen Antikörper zeigten überwiegend gegensätzliche Regulationen auf die Entstehung und Funktion der OC (**Abb. 14**). Dies war jedoch nicht selbstverständlich zu erwarten und eine entsprechende Annahme wäre angesichts der zahlreichen Faktoren, die die Kommunikation zwischen Checkpoint-Molekülen und ihren Liganden beeinflussen, zu undifferenziert gewesen und würde der Komplexität der Regulation nicht gerecht werden.

Zudem war für die Exaktheit der Ergebnisse der zahlreichen untersuchten Checkpoint-Modulatoren die Protein-Antikörper-Interaktion entscheidend. Diverse Studien belegen diese essentielle Voraussetzung zelltypspezifischer Analysen durch den Nachweis, dass PBMC die Liganden der getesteten Checkpoint-Moleküle exprimieren, sodass eine Regulation durch Checkpoint-Moleküle angenommen werden konnte (Chauvin und Zarour, 2020; Harjunpää und Guillerey, 2020; Oomizu et al., 2012; Philips et al., 2020; Takahashi, 2018; Tian et al., 2020).

1.4.1 PD-1

Die Induktion mittels des PD-1-Proteins führte in unserer Studie zu einer Stimulation der Osteoklastogenese sowie zur Größenzunahme von OC und OC-Vorläuferzellen. Die Knochenresorption durch OC als professionelle Phagozyten wird im Forschungsfeld zumeist mit der Phagozytose durch Makrophagen in der pro-inflammatorischen M1-Polarisation verglichen (Lampiasi et al., 2016; Pereira et al., 2018; Sun, Y et al., 2021; Yao et al., 2021). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass PD-1 in PBMC von Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose signifikant erhöht ist. Dieser Zustand gestörter Aktivitätsregulation von OC und OB korreliert zudem mit erhöhten Spiegeln C-reaktiven Proteins (CRP), die Ausdruck des pro-inflammatorischen Zustands sind (Cai et al., 2020). Folglich wird angenommen, dass PD-1 nicht nur die osteoblastäre

Knochensynthese inhibiert, sondern auch durch Freisetzung inflammatorischer Mediatoren die Osteoklastogenese fördert (Cai et al., 2020). In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hochregulation des PD-1-Signalwegs zu übermäßiger OC-Aktivität führte (Tai et al., 2018). Demnach ist anzunehmen, dass erhöhte PD-1-Expression Ausdruck pro-inflammatorischer Immunaktivität ist, die wiederum mit Abbau von Knochensubstanz und dem klinischen Bild der Osteoporose einhergeht (Greisen et al., 2022). Ebenso führte die PD-1-Herunterregulation in einem murinen Knochenkrebsmodell zu signifikant geringerer Zerstörung von Knochensubstanz (Wang et al., 2020). Folglich lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von OC durch übermäßige Stimulation von PD-1 zur Ausbildung eines osteoporotischen Phänotyps führt. Übereinstimmend mit diesen Studien konnten wir durch die Induktion mit einem blockierenden PD-1-Antikörper ebenso eine signifikante Limitierung der OC-Differenzierung in Anzahl und Größe nachweisen. Darüber hinaus wird der Nachweis der beeinträchtigten Osteoklastogenese nach PD-1-Inhibition durch Studien gestützt, die für Mäuse nach PD-1-ICI und genetischem Knockout abnormes Knochenwachstum zeigten (Cai et al., 2020; Nagahama et al., 2004).

Im Gegensatz dazu existieren einige wenige Publikationen, die das Auftreten von Osteoporose nach PD-1-Defizienz beschreiben. So wurde bei Patient*innen nach PD-1-ICI ein gestiegenes Frakturrisiko beobachtet (Moseley et al., 2018). Allerdings wurden in dieser Studie lediglich sechs Patient*innen eingeschlossen, sodass nicht zwingend ein kausaler Zusammenhang bestehen musste und diese Schlussfolgerung auch verfälscht sein könnte. Weiterhin wurden in einem PD-1-/PD-L1-Knockout-Mausmodell nach gesteigerter RANKL-Produktion verminderte trabekuläre Knochensubstanz sowie geschwächte Mikrostruktur der Knochen beschrieben (Greisen et al., 2022). Wenngleich bestimmte Details abweichend beurteilt werden, sind sich auch diese Autoren grundsätzlich einig hinsichtlich der Relevanz des PD-1-Signalwegs für den Erhalt der optimalen Knochenhomöostase sowie insbesondere für die Regulation der Osteoklastogenese.

1.4.2 PD-L1

PD-L1 ist als einer der Liganden von PD-1 Teil des regulatorischen PD-1-Checkpoint-Signalwegs, dem große Bedeutung in der Regulation des Knochenstoffwechsels

zukommt. In unserer Studie konnten für die Induktion mit PD-L1 vergleichbare Stimulationen der Größe und Anzahl von OC wie nach der Applikation von PD-1 gezeigt werden, jedoch waren diese insgesamt etwas geringer ausgeprägt. Umgekehrt hat der inhibitorische PD-L1-Antikörper die Osteoklastogenese negativ beeinflusst, verglichen mit der antagonistischen PD-1-Antikörper-Induktion jedoch weniger stark herunterreguliert. Wenn die PD-1-medierte Aktivierung der Osteoklastogenese und Förderung der OC-Funktion mit der Stimulation von Immunzellen verglichen werden, stimmen die Ergebnisse kürzlich publizierter, ähnlicher Studien nicht mit den unseren überein. So fördern PD-L1⁺ T-Zellen die Polarisation des immunsuppressiven M2-Makrophagen-Phänotyps, vergleichbar mit den Effekten, die durch PD-1 auf Makrophagen resultieren (Diskin et al., 2020). Damit einhergehend konnte nach Applikation eines inhibitorischen PD-L1-Antikörpers ein Übergang zum pro-inflammatorischen M1-Makrophagen-Typ gezeigt werden (Cai et al., 2019; Xiong et al., 2019). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass diese Studien auf T-Zellen und Makrophagen fokussiert sind, die zwar eine gewisse Relation zu OC präsentieren, jedoch können diese Ergebnisse nur als Anhalt verstanden und keinesfalls vollständig auf OC projiziert werden.

Wir konnten unsere Ergebnisse der PD-L1-Modulatoren sowohl für die Osteoklastogenese als auch für die OC-Funktion durch die Analyse des therapeutischen anti-PD-L1-Antikörpers Nivolumab reproduzieren. Es zeigte sich sogar eine dosisabhängige Reduktion der OC-Differenzierung, sodass von einer tatsächlichen Regulation im Sinne der Stimulation durch PD-L1 und Inhibition durch antagonistische PD-L1-Antikörper, beziehungsweise PD-L1-ICI, auszugehen ist.

1.4.3 PD-L2

Anders als durch die Regulation mittels PD-1 und PD-L1, präsentierte sich für PD-L2 eine Herunterregulation der Osteoklastogenese sowie durch den korrespondierenden inhibitorischen Antikörper ein positiver Einfluss auf die OC-Differenzierung. Verglichen mit der Interaktion von PD-1 und PD-L1, konnten durch die Stimulation mit PD-L2 kontrastierende Effekte nachgewiesen werden, sodass der Nachweis einer zweiseitigen Regulation der Knochenhomöostase durch den PD-1-Signalweg gelang. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, die durch PD-L2-Induktion nicht nur eine negative Regulation der TRAP-Aktivität in RANKL- und M-CSF-

stimulierter Zellkultur, sondern auch die verringerte Differenzierung sowie Aktivität Anti-Citrulliniertes-Peptid-Antikörper-abhängiger OC auf synthetischen Calciumphosphat-Platten determinieren konnten. Ein Einfluss auf OB konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Da ebenso PD-L2-defiziente Mäuse durch eine verringerte Knochendichte und mangelhafte Mikrostruktur der Knochen auffielen, stützt diese Studie unsere Ergebnisse der *in vitro* Analysen zum Einfluss von PD-L2 in der OC-Kultur (Greisen et al., 2020).

1.4.4 PD-1-assoziierte Moleküle

In dieser Studie fällt beim Vergleich der Mediatoren des PD-1-Signalwegs auf, dass die negative OC-Regulation durch den inhibitorischen PD-1-Antikörper stärker ausgeprägt war als durch den PD-L1-Antikörper. Die korrespondierenden agonistischen Proteine lösten hingegen eine Stimulation der Osteoklastogenese aus. Es hätte erwartet werden können, dass die Herunterregulation der OC-Differenzierung durch PD-L2 überwöge, wenn lediglich PD-L1 blockiert wurde, dies war jedoch nicht der Fall. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass weitere Liganden oder Co-Faktoren Teil der PD-1-assoziierten OC-Regulation sein müssen. Ferner sind reziproke Interaktionen von PD-1 mit den Liganden vorstellbar, sodass diese durch eine PD-L1-Blockade unterbrochen werden würden und demnach die Inhibition der Osteoklastogenese weniger stark als erwartet ausfällt.

Solch wechselseitige Effekte der PD-1-Liganden sind verschieden erklärbar. Zum einen ist PD-L1 sowohl auf hämatopoetischen als auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen weitgehend exprimiert, wohingegen die Expression von PD-L2 auf APZ, beispielsweise dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten und einige B-Zellen, beschränkt ist (Philips et al., 2020; Zak et al., 2017). Unklar ist, ob und falls ja, wie dies die Regulation der OC-Differenzierung beeinflusst (Dyck und Mills, 2017). Eine frühe Regulation der Osteoklastogenese überwiegend durch PD-L1 und in späteren Stadien vor allem durch PD-L2 scheint aber plausibel. Ferner konkurrieren beide Liganden um die Bindung an PD-1, die auf molekularer Ebene jedoch grundlegend verschieden erfolgt (Ghiotto et al., 2010). Aufgrund schneller biphasischer Dissoziation und einer fehlenden Konformationsänderung, die für eine effiziente Interaktion essentiell wäre, ist die Affinität von PD-L1 zu PD-1 gering ausgeprägt (Ghiotto et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist die Bindung von PD-L2 zu PD-1 um den Faktor 3 stärker. Dies wird einer PD-L2-spezifischen

„Verriegelung“ (Philips et al., 2020) sowie einer Formänderung der Bindungsstelle nach PD-1-PD-L2-Interaktion (Zak et al., 2017) zugesprochen, welche die Bindungsqualität erheblich verbessern. Weiterhin ist bekannt, dass PD-L2 konstant von PD-1 dissoziiert, dadurch PD-L1-bedingten Effekten entgegenwirken und letztlich eine Herunterregulation der Osteoklastogenese auslösen kann (Dyck und Mills, 2017; Ghiotto et al., 2010). Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass sich beide PD-1-Liganden gegenseitig dosisabhängig inhibieren können (Ghiotto et al., 2010; Philips et al., 2020), sodass weitere Erkenntnisse zu dieser Thematik unbedingt vonnöten sind.

In unserer Studie konnte die negative Regulation der OC durch PD-L1-Inhibition bestätigt werden, da Nivolumab als therapeutischer PD-1-Inhibitor eine vergleichbare Reduktion der Anzahl, Größe und Resorptionsaktivität der OC auslöste. Darüber hinaus ist auch nach Applikation von DPPA-1 als potentem Inhibitor der PD-1-PD-L1-Interaktion ein maximal negativer Effekt auf die Differenzierung und Aktivität der OC aufgefallen, die unsere zuvor erhobenen Ergebnisse validieren.

1.4.5 TIGIT

Die Induktion mit dem TIGIT-Protein führte zu einer Reduktion sowohl der Größe als auch der Anzahl von OC, übereinstimmend mit Ergebnissen aus Studien zum Einfluss von TIGIT auf Monozyten und Makrophagen als OC-Vorläufern. Diesbezüglich wurde beschrieben, dass TIGIT die Immunaktivität dieser mononukleären Zellen herunterregulieren (Das et al., 2017), die Funktion muriner peritonealer Makrophagen einschränken und diese durch Expression von IL-10 hin zum anti-inflammatorischen M2-Phänotypen polarisieren kann (Chen et al., 2016).

Im Gegensatz dazu resultierte die Applikation des inhibitorischen TIGIT-Antikörpers in unserer Studie in einer signifikanten Stimulation der Osteoklastogenese. Damit übereinstimmend ist publiziert, dass TIGIT-Knockout-Mäuse die inflammatorische M1-Makrophagen-Polarisation präsentieren und folglich anfälliger für Autoimmunerkrankungen sind (Chen et al., 2016).

Anders verhielt es sich mit der Lyse der knochenähnlichen Calciumphosphat-Oberfläche, da hierbei die Aktivität der OC durch die Induktion mit dem TIGIT-Protein lediglich in nicht-

signifikantem Ausmaß gesteigert wurde. Nichtsdestotrotz blieb die Grundtendenz der Checkpoint-Regulation durch die TIGIT-Moleküle bestehen, dadurch, dass der Einsatz des antagonistischen Antikörpers deutlich gesteigerte Lyseaktivität zeigte – nicht nur im Vergleich zur Kontrollgruppe, sondern insbesondere auch im Vergleich zur Proteinapplikation.

1.4.6 Tim-3

Für die Induktion mit Tim-3 konnte eine Reduktion der Osteoklastogenese beobachtet werden, deren Ausmaß sich vergleichbar mit der Herunterregulation nach TIGIT-Applikation zeigte. Dieses Ergebnis wird durch bereits publizierte Studien gestützt, die durch Tim-3 geringere Anteile M1-typisierter Makrophagen, beziehungsweise eingeschränkte Produktion pro-inflammatorischer Marker wie TNF- α , IFN- γ und IL-12, zeigen konnten (Das et al., 2017; Ocaña-Guzman et al., 2016). Ebenso sind für den Liganden Galectin-9 antagonistische Auswirkungen auf die Osteoklastogenese beschrieben und in einem murinen *in vitro* Modell konnte zudem ein inhibitorischer Effekt auf Knochenmarksmakrophagen durch die Limitierung pro-inflammatorischer Marker (IL-12, IL-17, IFN- γ) nachgewiesen werden (Moriyama et al., 2014; Tai et al., 2018).

Für den blockierenden Tim-3-Antikörper konnten wir eine Stimulation der Osteoklastogenese beobachten, die durch den pro-inflammatorischen Effekt der gesteigerten Sekretion von IL-12, IL-6 und IL-10 gut nachvollziehbar ist. Von diesen ist insbesondere IL-12 ein stark inflammatorischer Mediator, der zur Stimulation der OC-Differenzierung sowie -Aktivität und damit dem Abbau von Knochensubstanz beiträgt (Ocaña-Guzman et al., 2016).

Jedoch sind auch gegensätzliche Auswirkungen für die Tim-3-Applikation beschrieben, beispielsweise eine Korrelation der Tim-3-Expression mit der Anzahl TRAP⁺ Zellen als OC-Vorläufern (Moriyama et al., 2014). Ferner konnte für die Anwendung eines antagonistischen Tim-3-Antikörpers die Limitierung der PD-1-Expression auf THP-1-Zellen, einer humanen OC-ähnlichen Zelllinie, beobachtet werden (Ocaña-Guzman et al., 2016). Unseren Ergebnissen nach würde eine PD-1-Defizienz die Reduktion der OC-Differenzierung bedeuten, wohingegen für die Tim-3-Inhibition vermehrte OC-Zahlen und -Aktivität resultierten. Andererseits ist kürzlich publiziert worden, dass die Stimulation

mittels PD-1 den Anteil von OC in der Kultur reduziert (Greisen et al., 2022), dies würde wiederum den in unserer Studie registrierten Trend der gesteigerten OC-Differenzierung für den inhibitorischen Tim-3-Antikörper bestätigen. Diesbezüglich kann angenommen werden, dass die Auswirkungen durch Tim-3 auf die Osteoklastogenese überwiegen, auch wenn geringere PD-1-Level vermutlich die OC-Stimulation durch einen antagonistischen Tim-3-Antikörper behindern würden. Nichtsdestotrotz gestaltet sich ein solcher Vergleich anhand der Auswirkungen auf eine THP-1-Zelllinie äußerst kompliziert und Ergebnisse können nicht uneingeschränkt auf humane OC aus PBMC übertragen werden.

1.4.7 GITR

Die Anwendung des GITR-Proteins bewirkte, übereinstimmend mit aktuellen Publikationen, eine Zunahme sowohl der Größe als auch der Anzahl von OC. Bereits bekannt ist, dass durch die Interaktion von GITR mit dem Liganden GITRL die Osteoklastogenese durch RANKL-Stimulation und Herunterregulierung von Osteoprotegerin gefördert und letztlich die Osteogenese negativ beeinflusst wird (Shin et al., 2006). Ferner ist publiziert, dass GITR proinflammatorisch auf Autoimmunerkrankungen und chronisch-inflammatorische Zustände einwirkt (Fu et al., 2020; Tian et al., 2020). GITR steht außerdem auch im Zusammenhang mit dem proinflammatorischen M1-Profil sowie der Stimulation pro-inflammatorischer Zytokine (Fu et al., 2020; Shin et al., 2006). Da diese Erkenntnisse mit unseren Ergebnissen für die Regulation durch GITR übereinstimmen, ist anzunehmen, dass eine GITR-Stimulation die Aktivierung der Immunantwort nach sich ziehen und die GITR-ICI eine sinnvolle Therapiemöglichkeit autoimmuner Erkrankungen präsentieren könnte.

Umgekehrt wurde vermutet, dass der inhibierende GITR-Antikörper die Differenzierung von OC beeinträchtigen würde. Diese Annahme stellte sich jedoch als nicht korrekt heraus, da trotz der Induktion sowohl die Größe als auch die Anzahl der OC auf einem mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Level verblieben. Möglicherweise ist dies bedingt durch eine lediglich minimale Expression des GITR-Proteins durch die kultivierten Zellen, die für eine erfolgreiche Protein-Antikörper-Interaktion höher sein müsste. Unsere primäre These wird jedoch durch eine aktuelle Arbeit gestützt, die für GITR-defiziente

Makrophagen deutlich beeinträchtigte Proliferation und Phagozytosefähigkeit beschreibt (Fu et al., 2020).

1.4.8 CD47

Die Regulation der Osteoklastogenese mittels des CD47-Proteins führte zu einer vergleichbaren Stimulation wie nach der Applikation des GITR-Proteins. Dabei bedeutet die Bindung von CD47 an den Liganden SIRP α ein Anti-Phagozytose-Signal, nicht nur für Makrophagen, sondern auch für OC (Chao et al., 2019; Hobolt-Pedersen et al., 2014; Liu et al., 2020; Lundberg et al., 2007). In unserer Studie resultierten nach der Applikation von CD47 die kleinsten TRAP⁺ Zellen, vergleichbar mit einer Publikation von Hobolt-Pedersen et al. (2014), die ebenso zeigen konnten, dass CD47⁻ Zellen signifikant größer als CD47⁺ OC und OC-Vorläuferzellen ausfielen.

Eine deutlich reduzierte OC-Zahl nach Applikation eines antagonistischen CD47-Antikörpers hätte angenommen werden können, jedoch verblieb die Zahl der Gesamt-OC in unserer Testung etwa auf dem Niveau der Kontrollgruppe, beziehungsweise dem des inhibitorischen GITR-Antikörpers. Dadurch, dass aus CD47-defizienten Makrophagen hingegen eine signifikant verringerte Anzahl von Gesamt-OC resultierte, liegt wiederum die Vermutung nahe, dass eine zu geringe Expression des CD47-Proteins vorlag, sodass die Protein-Antikörper-Induktion nicht ausreichend erfolgen konnte und folglich keine Reduktion der OC-Zahl stattfand.

Ebenso konnten für die Regulation durch den blockierenden CD47-Antikörper kaum Änderungen der TRAP⁺ Zellgröße registriert werden, dies ist allerdings übereinstimmend mit bereits publizierten Studien. So sind für CD47-defiziente Mäuse sowohl eine reduzierte OC-Zellgröße (Lundberg et al., 2007) als auch ein erhöhtes Knochenvolumen (Uluçkan et al., 2009), beschrieben, letzteres ist vermutlich durch eine reduzierte OC-Funktion erklärbar.

1.4.9 Technische Herausforderungen in der quantitativen und qualitativen Analyse von Osteoklasten

Das hier angewandte experimentelle Studiendesign weicht teils von bereits publizierten Arbeiten im komplexen Feld der OC-Biologie ab. Ziel unserer Studie war die exakte und

objektive Untersuchung der Auswirkungen von Checkpoint-Mediatoren auf die Osteoklastogenese sowie der funktionellen OC-Aktivität. Aufgrund der immensen Variabilität der Morphologie von OC-Vorläufern und OC wurde hierfür die manuelle Analyse gegenüber einer automatisierten Auswertung bevorzugt, um der technisch bedingten Fehleranfälligkeit entgegenzuwirken und der Komplexität der OC-Kultivierung weitmöglichst gerecht zu werden.

Zunächst erfolgte die Auswertung der durchschnittlichen Zellgröße TRAP⁺ Zellen zur primären Evaluation der Osteoklastogenese. Überwiegend präsentieren sich OC-Vorläuferzellen flächenmäßig kleiner als reife OC, sodass diese Untersuchung eine recht akkurate Einschätzung des Differenzierungsgrades der OC lieferte. Genauere Analysen erfolgten mithilfe der wesentlich zeit- und arbeitsintensiveren manuellen Zählung und Differenzierung der Zellgruppen. Für die multinukleären OC konnte kein konstanter Prozentsatz beobachtet werden, stattdessen veränderte sich ihr Anteil überwiegend proportional zu dem der Gesamt-OC, sowohl nach der Induktion mit stimulierenden Checkpoint-Proteinen als auch nach der Applikation korrespondierender inhibitorischer Antikörper. Folglich ließ sich schlussfolgern, dass in diesem Screening insbesondere die kleinen OC für Abweichungen von der OC-Kontrollgruppe verantwortlich waren. Erklärbar ist dies dadurch, dass während der Osteoklastogenese mehrere kleine OC zu wenigen OC-Riesenzellen fusionieren, sodass ein Überwiegen der großen OC nicht realistisch scheint. Außerdem verbleiben OC zum einen länger in der oligonukleären Konfiguration, zum anderen steigt mit zunehmender Kernzahl die Suszeptibilität für Apoptose. Anhand dieses Ungleichgewichts der OC-Größe und der Anzahl von Zellkernen lässt sich schlussfolgern, dass das Überwiegen der kleinen OC eher nicht durch unterschiedliche Genese bedingt ist, sondern vielmehr durch den Maturationsprozess der OC selbst.

Im Gegensatz zu diversen anderen Publikationen im Feld der OC-Biologie konnte in dieser Studie trotz der charakteristischen morphologischen sowie immensen funktionellen Heterogenität eine akkurate Analyse der OC-Vorläufer und OC gewährleistet werden, indem Aufnahmen in mindestens zwei verschiedenen Vergrößerungsstufen in gesamten Kulturwells erfolgten und genügend ROIs ausreichender Größe zur Analyse genutzt wurden. Dies ist bisher nur in wenigen anderen Studien vergleichbar umgesetzt worden, sofern das methodische Vorgehen überhaupt derart detailliert ausgeführt wurde. Gleichmaßen minimal wurde oftmals auch die Beschreibung der analytischen

Herangehensweise gestaltet, sodass selten erkennbar ist, ob und falls ja, welche Software zur Zellzählung verwendet wurde. In unserer Studie wurde die manuelle gegenüber einer automatisierten Auswertung der Zellzahlen bevorzugt, da erfahrungsgemäß jede Software bisher unterschiedlich intensive TRAP-Färbungen, Überlagerungen, verschieden große sowie bereits apoptotische Zellen nicht vollständig korrekt erfassen und demnach die morphologische Heterogenität nicht zufriedenstellend berücksichtigen konnte. Weiterhin wurde eine ausreichend große Fallzahl eingeschlossen sowie die Differenzierung oligo- und multinukleärer OC vorgenommen, um einer statistischen Verzerrung durch die Inhomogenität zwischen Spendern, Versuchen und sogar innerhalb einzelner Wells vorzubeugen und repräsentative Daten der Checkpoint-Regulation zu erfassen. Bedauerlicherweise wurden auch diese Aspekte in experimentellen OC-Studien bislang nicht genügend berücksichtigt.

Neben der Quantität wurde auch die Qualität der OC untersucht, da aktuelle Studien eine Korrelation von Größe, Anzahl und Aktivität von OC belegen (Abdallah et al., 2018; Hiram-Bab et al., 2015; Nakamura et al., 2013), sich jedoch die Frage nach einem zugrundeliegenden Kausalzusammenhang stellte. Folglich wurde die Lysierung der knochenähnlichen Calciumphosphat-Oberfläche analysiert, die den ersten Schritt der osteoklastären Knochenresorption darstellt (Bohatirchuk, 1966; Hienz et al., 2015; Väänänen, 2005) und eine Aussage über die Regulation der essentiellen präresorptiven Aktivität der OC unter Einfluss der Immuncheckpoint-Mediatoren erlaubt. Die erhobenen Ergebnisse dieser vielfach angewandten und weit akzeptierten Untersuchung ließen darauf schließen, dass Quantität und Qualität der OC durchaus kausal korrelieren und eine wechselseitige Beeinflussung vorliegt (Ciapetti et al., 2017; Jansen et al., 2022; Nakamura et al., 2013; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022).

Diesbezüglich lässt sich einwenden, dass alternativ auch die Resorption von Knochen durch OC beurteilt und somit eine realitätsnähere Analyse geboten werden könnte (Badran et al., 2012; Bernhardt et al., 2017; Panagopoulos et al., 2017). Eine synthetische Calciumphosphat-Beschichtung kann die Komplexität echten Knochens nicht in ihrer Gesamtheit imitieren, allerdings führt ebendiese zu einer noch ausgeprägteren Heterogenität innerhalb der Kultur und reduziert infolgedessen die Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Funktionsanalyse. Es wurden für die Studie mehrere Versuche

unternommen, eine OC-Kultur auf Dentin- oder Knochenscheiben zu etablieren, diese genügten jedoch letztlich nicht den Qualitätsansprüchen, da sich einige problematische Aspekte herausstellten: Zum einen konnten deutlich weniger vitale und insgesamt wesentlich kleinere OC kultiviert werden, zum anderen wurde bei minimalsten Unregelmäßigkeiten der Knochenscheiben ein Abrutschen der Vorläuferzellen festgestellt, sodass entstandene Resorptionslakunen nicht realistisch bewertet werden konnten. Verglichen mit der *in vitro* Kultur von OC auf Glas-Objektträgern, trat die Variabilität sowohl zwischen Spendern als auch zwischen Versuchen sowie innerhalb der Kulturwells deutlich prominenter hervor und stellt ein bekanntes Problem in der Bewertung der OC-Aktivität dar (Chen et al., 2018; Hadjidakis und Androulakis, 2006; Nakashima und Takayanagi, 2011). Angesichts einer solchen Heterogenität hätte eine Auswertung der Resorptionsaktivität in Teilen der Wells die Qualität der Analyse sogar minimiert, da keine repräsentative Platzierung der ROIs möglich gewesen war. Ferner konnten die TRAP- und Coomassie-Färbungen zur Auswertung nicht auf denselben Knochenchips durchgeführt werden und sowohl Dentin- als auch Knochenscheiben fielen durch eine beträchtliche Eigenanfärbbarkeit auf, sodass Auswertung und Analyse deutlich erschwert wurden. Insofern war die Untersuchung der osteoklastären Knochenresorption durch eine technisch schwierig umzusetzende Analyse gekennzeichnet, damit einhergehend eine geringe Reproduzierbarkeit und folglich eingeschränkte Vergleichbarkeit, sodass angesichts der vernachlässigbaren Relevanz von einer Publikation dieser Ergebnisse abgesehen wurde. Diese Faktoren stellten insbesondere angesichts der hier durchgeführten Übersichtsarbeit Ausschlusskriterien für solch eine Form der Auswertung dar, da zur Optimierung der Reliabilität sowie der statistischen Aussagekraft der Ergebnisse deutlich mehr Replikate hätten untersucht werden müssen. Automatische Analysen sind immens fehlerbehaftet, wohingegen eine manuelle Auswertung zwar deutlich präziser ist, aber mit einem umso größeren zeitlichen Aufwand einhergeht. Hinsichtlich der überwiegend händischen Auswertung der zahlreichen Konditionen einer Screening-Analyse ist solch ein Versuchsplan momentan sowohl aus finanzieller als auch aus zeitlicher Perspektive nicht realistisch umsetzbar.

Folglich konnte ein direkter Einfluss der Checkpoint-Modulatoren auf die Knochenresorption der OC nicht bewiesen werden. Anhand der weniger heterogenen und insgesamt reliablen Ergebnisse der Calciumphosphat-Lyse konnte die grundsätzliche

Regulation der OC-Aktivität jedoch annäherungsweise beurteilt werden und stellte die bestmögliche Methode für die Untersuchung zahlreicher Modulatoren dar. Eine realitätsnähere Evaluation der OC-Aktivität bietet die Quantifizierung von Knochenresorption allerdings nur für den Vergleich weniger ausgewählter Konditionen, da nur dabei eine entsprechend hohe Fallzahl und akkurate Auswertung gewährleistet werden kann.

Zuletzt ist zu berücksichtigen, dass die Literatur im Feld der experimentellen OC-Forschung derzeit nicht nur schwierig vergleichbar, sondern auch lediglich eingeschränkt geeignet ist, begründete Schlussfolgerungen hinsichtlich der Regulation von OC zu ziehen. Dazu tragen diverse Faktoren bei, darunter fundamentale Unterschiede zwischen OC und OC-Vorläufern, humanen und murinen OC sowie stark abweichende Versuchsbedingungen und -analysen. Darüber hinaus sind die Auswirkungen von Immuncheckpoint-Modulatoren sehr stark Zelltyp-abhängig (Brom et al., 2022; Brom et al., 2023; Lei et al., 2021; Schildberg et al., 2016; Sharma und Allison, 2015), Immuncheckpoint-spezifische Arbeiten im Feld der (humanen) OC-Biologie allerdings selten, sodass sich Abweichungen unserer Ergebnisse von Publikationen mit ähnlichen Fragestellungen erklären lassen.

1.4.10 Klinische Relevanz der Immuncheckpoint-Regulation von Osteoklasten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Studie einen entscheidenden Beitrag zur Optimierung der derzeitigen Methodik der OC-Forschung leisten konnte, hin zu zukünftig besser objektivierbaren und reproduzierbaren Ergebnissen. Zusätzlich zum bisherigen Goldstandard der OC-Analysen kann die besonders berücksichtigte Standardisierung der experimentellen Herangehensweise in der Analyse humaner OC zukünftig valide Vergleiche innerhalb einzelner Versuche und zwischen verschiedenen Studien vereinfachen. Darüber hinaus konnten außerdem hochsignifikante Effekte auf die OC-Biologie durch Checkpoint-Regulation beobachtet werden. Diese Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis potentieller ossärer Nebenwirkungen von ICI als Krebstherapie bei. Diesbezüglich fallen insbesondere Patient*innen, die hinsichtlich ihrer Checkpoint-basierten Krebstherapie eine Komplettremission zeigen, durch klinisch relevante IRAEs auf, beispielsweise durch dermatologische und gastrointestinale

Infektionen, reduzierte Knochendichte und sogar Frakturen (Filippini et al., 2021; Moseley et al., 2018; Sun, L et al., 2021; Terashima und Takayanagi, 2018). Solche IRAEs können aufgrund der Zytokinausschüttung der T-Zellen im Rahmen der Immunaktivierung als hoch- oder sogar zu effiziente therapeutische Immunaktivierung verstanden werden (Filippini et al., 2021; Moseley et al., 2018). Zukünftig wird die zentrale Herausforderung hinsichtlich ICI in der Krebstherapie sein, ein Gleichgewicht zwischen der notwendigen anti-malignen Potenz und möglichst minimaler inflammatorischer, darunter oft auch ossärer, Nebenwirkungen herzustellen. Diesbezüglich wird es unabdingbar sein, zu analysieren, welche Moleküle, beziehungsweise welche ICI, Frakturen begünstigen, sowie mögliche optimale Dosierungen der Therapien zu eruieren. Darüber hinaus besteht die Chance, die derzeit nicht-ausreichenden Diagnostik- sowie Therapiemöglichkeiten von Erkrankungen mit Dysbalancen der Knochenhomöostase sowie ossärer Nebenwirkungen von ICI zu optimieren, sofern sich die Ergebnisse in weiteren Studien bestätigen lassen.

Für die ursächliche Therapie der Osteoporose ist es notwendig, übermäßig aktive OC zu regulieren beziehungsweise das Ungleichgewicht zwischen OC und OB zu korrigieren, sodass weniger Knochenabbau und stattdessen vermehrt Aufbau von Knochensubstanz erfolgt. Dafür scheint es plausibel, PD-1, PD-L1, GITR und CD47 einzeln oder kombiniert zu blockieren. Alternativ ist auch eine therapeutische Stimulation von PD-L2, TIGIT, Tim-3 oder DPPA-1 denkbar. Voraussetzung für diese beiden Optionen ist jedoch, dass die Modulationen OC-spezifisch erfolgen können, um neue, sowohl immunaktivierende als auch immunsupprimierende IRAEs zu verhindern. Zuvor sollte jedoch ein diagnostisches Screening hinsichtlich der Checkpoint-Expressionen erfolgen, um eine optimale, individualisierte Behandlung zu gewährleisten. Ein vergleichbares Vorgehen ist für gelockerte Gelenksendoprothesen zu erwägen. Zwar liegt dabei eine septische oder aseptische Entzündung zugrunde, analog zur Regulation der Makrophagen-Polarisation könnte jedoch mittels Checkpoint-Modulation die Balance zwischen OC- und OB-Aktivität wiederhergestellt werden. Die synergistische Regulation der ursächlichen T-Zell-medierten Zytokinsekretion (Cong et al., 2023) sollte diesbezüglich ebenso in Betracht gezogen werden.

Bei knocheneigenen Malignomen und Knochenmetastasen ist die Optimierung der Diagnostik und Behandlung jedoch komplizierter, da einerseits eine therapeutische ICI

zur Elimination des Tumors notwendig ist, andererseits das Frakturrisiko nicht nur durch die Therapie, sondern auch durch die Grunderkrankung signifikant erhöht ist. Demzufolge ist hierbei eine zellspezifische Checkpoint-Regulation umso relevanter. In Osteo-, Chondro- und Ewing-Sarkomen konnte bereits die Expression von Checkpoints, darunter PD-1 und PD-L1, nachgewiesen werden (Machado et al., 2018; Paydas et al., 2016; Torabi et al., 2017). Diese korrelierte mit dem Auftreten Tumor-infiltrierender Lymphozyten, die primär in Fällen von Metastasierung, Therapieresistenz, Rezidiven und vorwiegend schlechter Prognose präsent sind (Shen et al., 2014; Sundara et al., 2017). Bisher ist es nicht gelungen, PD-1 oder PD-L1 als Biomarker für das Therapieansprechen zu verwenden (Liao et al., 2017; Lizée et al., 2013), dennoch sollten zukünftig Versuche unternommen werden, diese und weitere Immuncheckpoints diagnostisch und therapeutisch zu nutzen, da die hohe Checkpoint-Infiltration einen „heißen“ Tumor repräsentiert und mehrheitlich gut auf immunologische Therapieansätze anspricht (Brown et al., 2018). Angesichts der besonderen Interaktion des Knochenmarks und des Immunsystems stellen Knochenmetastasen eine weitere schwierig behandelbare Pathologie dar, die durch den „Teufelskreis“ aus gesteigerter OC-Aktivität und Immunevasion der malignen Zellen charakterisiert ist (Del Conte et al., 2022; Liu et al., 2021). Es ist denkbar, dass diese Endlosschleife mittels (Kombinations-) ICI durchbrochen werden könnte, da diese „kalte“ zu „heißen“ Tumorumgebungen transformieren können, also eine Infiltration mit Immunzellen begünstigen (Zhu et al., 2022). In Vorbereitung auf oder in Kombination mit derzeit angewandten Therapien, darunter Chemo-, Anti-Angiogenese- oder RANKL-Inhibitions-Therapien, bestünde die Möglichkeit, eine effektivere Elimination der abgesiedelten Tumorzellen zu erzielen. Eine Kombination aus Inhibition von RANKL und CTLA-4-ICI zeigte bereits positive Auswirkungen auf die Immunogenität der Tumorumgebung solider Tumore und Metastasen (Van Dam et al., 2019), sodass ein gezielter therapeutischer Angriff vielversprechend scheint.

Um individuell kalkulierte Therapiepläne zu erstellen, ist ein Screening auf exprimierte Immuncheckpoints in Metastasen und knocheneigenen Tumoren essentiell. Zudem scheint es sinnvoll, die Checkpoint-Expressionsmuster auch während einer Behandlung als Biomarker für das Therapieansprechen oder mögliche Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen zu nutzen. Die Messung der Expressionslevel könnte dabei

sowohl als Gewebebiopsie oder deutlich schneller und einfacher zu wiederholen als sogenannte „Liquid Biopsy“ in einer Blutprobe vorgenommen werden (Wang et al., 2022). Werden nach gründlicher Diagnostik zu Beginn oder während der Therapie einer Erkrankung mehrere Checkpoints als ursächlich erachtet, würden sich Kombinations-ICI oder -Stimulationstherapien anbieten. Einerseits ergibt sich dadurch schon jetzt ein effektiveres Krankheitsmanagement, andererseits sind auch die Überlebensraten verbessert (Barrueto et al., 2020; Rameshbabu et al., 2021; Wang et al., 2022). Bedauerlicherweise haben Kombinations-ICI bisher deutlich mehr und stärkere Nebenwirkungen zur Folge gehabt (Friedman et al., 2016; Zhang et al., 2018). Um diese zu umgehen, sollten sämtliche Checkpoint-Regulationen zelltypspezifisch erfolgen, weil diese nicht nur weniger toxisch auf den gesamten Organismus wirken, sondern vermutlich auch eine geringere oder spätere Resistenzentwicklung aufweisen würden. Es gilt, die Balance zwischen effektiver Therapie und Immuntoleranz zu wahren, folglich sollten personalisierte Checkpoint-Therapieschemata entwickelt und gegebenenfalls mit bereits erprobten Behandlungen kombiniert werden, um bestmögliche Erfolge zu erzielen (Sabbatino et al., 2022). Unbedingt berücksichtigt werden müssen dabei einerseits die systemischen Effekte solcher therapeutischen Vorhaben und andererseits, ob und wenn ja, wie sehr solch eine Checkpoint-Modulation andere Zellen, sowohl solche von Relevanz in der Knochenhomöostase als auch die systemische Immunreaktion betreffende, beeinflusst.

Abschließend lassen sich die eingangs gestellten Forschungsfragen wie folgt beantworten: Immuncheckpoint-Moleküle haben einen wesentlichen Einfluss auf die Osteoklastogenese sowie die Funktion der reifen OC. Verluste der Knochensubstanz infolge einer Dysbalance des Knochenstoffwechsels konnten nach Applikation der Regulatoren PD-1, PD-L1, GITR und CD47 sowie infolge der Inhibition von PD-L2, TIGIT, Tim-3 und DPPA-1 registriert werden. Folglich kann die Messung der Expression dieser Checkpoints beziehungsweise SMI einen diagnostischen Nutzen für eine Vielzahl von Erkrankungen bieten, die durch einen übermäßigen Knochenabbau charakterisiert sind. Ebenso eröffnen sich vielversprechende neue therapeutische Möglichkeiten mit einer zelltypspezifischen ICI von PD-1, PD-L1, GITR oder CD47 sowie einer OC-spezifischen therapeutischen Stimulation von PD-L2, TIGIT, Tim-3 oder DPPA-1, gegebenenfalls auch in Kombinationsbehandlungen.

Insofern soll unsere Studie als Pilotprojekt verstanden werden, das vielversprechende Erkenntnisse erbracht hat und einen Grundstein für weitere Forschung legen kann. Zukünftig sollten vielversprechende Immuncheckpoint-Moleküle, die besonders in der quantitativen Analyse Auswirkungen auf die Osteoklastogenese zeigen, trotz der technischen Herausforderungen unbedingt in weiteren aufbauenden Studien analysiert werden, um langfristig die Versorgung der Patient*innen zu optimieren. Denkbar sind in dieser Hinsicht unter anderem Analysen weiterer Checkpoint-Mediatoren, die Untersuchung von Checkpoint-medierten Effekten auf weitere Zellen der Knochenhomöostase oder *in vivo* Modellstudien.

1.5 Zusammenfassung

Bereits jetzt hat Immuncheckpoint-Inhibition die Therapie maligner Erkrankungen revolutioniert und wird auch zukünftig eine wertvolle Ergänzung der Behandlungsschemata inflammatorischer und autoimmuner Krankheiten darstellen. Mit der erheblichen anti-malignen Wirksamkeit gehen jedoch auch kritische Nebenwirkungen einher, die sich durch die Inhibition sekundärer immunregulatorischer Mechanismen auto-inflammatorisch präsentieren. Teils sind diese so gravierend, dass ein Therapieabbruch unausweichlich wird. Das Auftreten dieser „Immune-related adverse events“ könnte potentiell durch eine zelltypspezifische Checkpoint-Blockade reduziert werden. Im Kontext der Nebenwirkungen, die den Knochenstoffwechsel betreffen, sind Makrophagen als Teil der angeborenen sowie erworbenen Immunreaktion und speziell als OC-Vorläuferzellen sowie reife OC von besonderer Relevanz.

Zur Analyse der Auswirkungen von therapeutischer Checkpoint-Regulation auf OC wurde ein *in vitro* Modell der OC-Differenzierung ausgehend von humanen PBMC entwickelt. Die Osteoklastogenese unter dem Einfluss agonistischer Checkpoint-Proteine und antagonistischer Antikörper wurde in einem umfassenden Screening-Ansatz sowohl quantitativ als auch qualitativ mittels Immunfluoreszenzfärbung, Messung der Zellgröße, manueller Zellzählung und Resorptionsaktivitätsbestimmung in großer Probenzahl ausgewertet. Trotz der OC-typischen Heterogenität konnten objektive, reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse erhoben werden. Infolgedessen konnte die Relevanz der Checkpoint-Regulation für die Knochenhomöostase bestätigt und die analysierten

Checkpoint-Mediatoren überdies in zwei Gruppen mit konträren OC-Effekten kategorisiert werden.

Somit ermöglichte diese Übersichts-Studie Fortschritte in der Auswertung von *in vitro* OC-Modellen hinsichtlich reproduzierbarer und weniger fehleranfälliger Analysen. Ebenso kann der Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Immuncheckpoint-Regulation des Knochenstoffwechsels auf Ebene der OC dazu beitragen, individualisierte diagnostische und therapeutische Optionen für Erkrankungen, die durch eine Fehlregulation der Knochenhomöostase charakterisiert sind, zu entwickeln. Zelltyp- und Checkpoint-spezifisch sollte hierfür nicht nur Immuncheckpoint-Inhibition, sondern insbesondere auch die Stimulation von Checkpoint-Regulatoren in Betracht gezogen werden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abdallah D, Jourdain M-L, Braux J, Guillaume C, Gangloff SC, Jacquot J, Velard F. An Optimized Method to Generate Human Active Osteoclasts from Peripheral Blood Monocytes. *Front Immunol* 2018; 9: 1-10

Ahmed F, Ibrahim A, Cooper CL, Kumar A, Crawley AM. Chronic Hepatitis C Virus Infection Impairs M1 Macrophage Differentiation and Contributes to Cd8(+) T-Cell Dysfunction. *Cells* 2019; 8: 1-18

Anderson AC, Anderson DE. Tim-3 in Autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 665-669

Apostu D, Lucaciu O, Berce C, Lucaciu D, Cosma D. Current Methods of Preventing Aseptic Loosening and Improving Osseointegration of Titanium Implants in Cementless Total Hip Arthroplasty: A Review. *J Int Med Res* 2018; 46: 2104-2119

Ardura JA, Rackov G, Izquierdo E, Alonso V, Gortazar AR, Escribese MM. Targeting Macrophages: Friends or Foes in Disease? *Front Pharmacol* 2019; 10: 1-8

Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, Song K, Kondo Y, Woodruff MC, Gogineni A, Onder L, Ludewig B, Weimer RM, Carroll MC, Mooney DJ, Xia L, Turley SJ. The Clec-2-Podoplanin Axis Controls the Contractility of Fibroblastic Reticular Cells and Lymph Node Microarchitecture. *Nat Immunol* 2015; 16: 75-84

Badran Z, Pilet P, Verron E, Bouler JM, Weiss P, Grimandi G, Guicheux J, Soueidan A. Assay of in Vitro Osteoclast Activity on Dentine, and Synthetic Calcium Phosphate Bone Substitutes. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23: 797-803

Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol* 2021; 16: 223-249

Bai J, Gao Z, Li X, Dong L, Han W, Nie J. Regulation of Pd-1/Pd-L1 Pathway and Resistance to Pd-1/Pd-L1 Blockade. *Oncotarget* 2017; 8: 110693-110707

Ban J, Fock V, Aryee DNT, Kovar H. Mechanisms, Diagnosis and Treatment of Bone Metastases. *Cells* 2021; 10: 1-30

Barrueto L, Caminero F, Cash L, Makris C, Lamichhane P, Deshmukh RR. Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy. *Transl Oncol* 2020; 13: 1-10

Bernhardt A, Schamel M, Gbureck U, Gelinsky M. Osteoclastic Differentiation and Resorption Is Modulated by Bioactive Metal Ions Co^{2+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} Incorporated into Calcium Phosphate Bone Cements. *PLoS One* 2017; 12: 1-18

Bohatirchuk F. Calciolysis as the Initial Stage of Bone Resorption. A Stain Historadiographic Study. *Am J Med* 1966; 41: 836-846

Borggrewe M, Kooistra SM, Noelle RJ, Eggen BJL, Laman JD. Exploring the Vista of Microglia: Immune Checkpoints in Cns Inflammation. *J Mol Med (Berl)* 2020; 98: 1415-1430

Brom VC, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of Immune Checkpoint Molecules on Macrophages in Cancer, Infection, and Autoimmune Pathologies. *Front Immunol* 2022; 13: 1-15

Brom VC, Strauss AC, Sieberath A, Salber J, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. Agonistic and Antagonistic Targeting of Immune Checkpoint Molecules Differentially Regulate Osteoclastogenesis. *Front Immunol* 2023; 14: 988365

Brown HK, Schiavone K, Gouin F, Heymann M-F, Heymann D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif Tissue Int* 2018; 102: 174-195

Burugu S, Dancsok AR, Nielsen TO. Emerging Targets in Cancer Immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 2018; 52: 39-52

Butler CA, Popescu AS, Kitchener EJA, Allendorf DH, Puigdemívol M, Brown GC. Microglial Phagocytosis of Neurons in Neurodegeneration, and Its Regulation. *J Neurochem* 2021; 1-19

Buzzatti G, Dellepiane C, Del Mastro L. New Emerging Targets in Cancer Immunotherapy: The Role of Gitr. *ESMO Open* 2020; 4: 1-8

Cai J, Qi Q, Qian X, Han J, Zhu X, Zhang Q, Xia R. The Role of Pd-1/Pd-L1 Axis and Macrophage in the Progression and Treatment of Cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145: 1377-1385

Cai XP, Zhao Q, Guo ZD, Lin SJ, Chen ZX, Chen MY, Zheng L, Zhao KW. Potential Diagnostic Value of Pd-1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Postmenopausal Osteoporosis Patients. *J Clin Lab Anal* 2020; 34: 1-6

Casimiro S, Guise TA, Chirgwin J. The Critical Role of the Bone Microenvironment in Cancer Metastases. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 310: 71-81

Cassetta L, Kitamura T. Macrophage Targeting: Opening New Possibilities for Cancer Immunotherapy. *Immunology* 2018; 155: 285-293

Chao MP, Takimoto CH, Feng DD, Mckenna K, Gip P, Liu J, Volkmer JP, Weissman IL, Majeti R. Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint Cd47 in Myeloid Malignancies. *Front Oncol* 2019; 9: 1-9

Chauvin JM, Zarour HM. Tigit in Cancer Immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2020; 8: 1-7

Chen X, Lu PH, Liu L, Fang ZM, Duan W, Liu ZL, Wang CY, Zhou P, Yu XF, He WT. Tigit Negatively Regulates Inflammation by Altering Macrophage Phenotype. *Immunobiology* 2016; 221: 48-55

Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connect Tissue Res* 2018; 59: 99-107

Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-Associated Macrophages: An Accomplice in Solid Tumor Progression. *J Biomed Sci* 2019; 26: 1-13

Chiavenna SM, Jaworski JP, Vendrell A. State of the Art in Anti-Cancer Mabs. *J Biomed Sci* 2017; 24: 1-12

Ciapetti G, Di Pompo G, Avnet S, Martini D, Diez-Escudero A, Montufar EB, Ginebra MP, Baldini N. Osteoclast Differentiation from Human Blood Precursors on Biomimetic Calcium-Phosphate Substrates. *Acta Biomater* 2017; 50: 102-113

Cong Y, Wang Y, Yuan T, Zhang Z, Ge J, Meng Q, Li Z, Sun S. Macrophages in Aseptic Loosening: Characteristics, Functions, and Mechanisms. *Front Immunol* 2023; 14: 1-17

Conroy M, Naidoo J. Immune-Related Adverse Events and the Balancing Act of Immunotherapy. *Nat Commun* 2022; 13: 1-4

Corsello SM, Barnabei A, Marchetti P, De Vecchis L, Salvatori R, Torino F. Endocrine Side Effects Induced by Immune Checkpoint Inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 1361-1375

Coschi CH, Juergens RA. The Price of Success: Immune-Related Adverse Events from Immunotherapy in Lung Cancer. *Curr Oncol* 2021; 28: 4392-4407

Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and Its Role in Regulating Anti-Tumor Immunity. *Immunol Rev* 2017; 276: 97-111

Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells During *Helicobacter Pylori* Infection. *J Immunol* 2006; 176: 3000-3009

De Martinis M, Sirufo MM, Ginaldi L. Osteoporosis: Current and Emerging Therapies Targeted to Immunological Checkpoints. *Curr Med Chem* 2020; 27: 6356-6372

Del Conte A, De Carlo E, Bertoli E, Stanzione B, Revelant A, Bertola M, Spina M, Bearz A. Bone Metastasis and Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer (Nslc): Microenvironment and Possible Clinical Implications. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 1-11

Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, Buttar C, Li E, Sundberg B, Salas RD, Chen R, Wang J, Kim M, Farooq MS, Nguy S, Fedele C, Tang KH, Chen T, Wang W, Hundeyin M, Rossi JaK, Kurz E, Haq MIU, Karlen J, Kruger E, Sekendiz Z, Wu D, Shadaloey SaA, Baptiste G, Werba G, Selvaraj S, Loomis C, Wong KK, Leinwand J, Miller G. Pd-L1 Engagement on T Cells Promotes Self-Tolerance and Suppression of Neighboring Macrophages and Effector T Cells in Cancer. *Nat Immunol* 2020; 21: 442-454

Dougall WC. Molecular Pathways: Osteoclast-Dependent and Osteoclast-Independent Roles of the Rankl/Rank/Opg Pathway in Tumorigenesis and Metastasis. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 326-335

Duan Z, Luo Y. Targeting Macrophages in Cancer Immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6: 1-21

Dyck L, Mills KHG. Immune Checkpoints and Their Inhibition in Cancer and Infectious Diseases. *Eur J Immunol* 2017; 47: 765-779

Ferguson JL, Turner SP. Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles. *Am Fam Physician* 2018; 98: 205-213

Filippini DM, Gatti M, Di Martino V, Cavalieri S, Fusaroli M, Ardizzoni A, Raschi E, Licitra L. Bone Fracture as a Novel Immune-Related Adverse Event with Immune Checkpoint Inhibitors: Case Series and Large-Scale Pharmacovigilance Analysis. *Int J Cancer* 2021; 149: 675-683

Friedman CF, Proverbs-Singh TA, Postow MA. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review. *JAMA Oncol* 2016; 2: 1346-1353

Fu Z, Wang S, Li J, Zhang Y, Li H, Li G, Wan X, Zhang Y. Biological Role of Gitr/Gitrl in Attributes and Immune Responses of Macrophage. *J Leukoc Biol* 2020; 107: 309-321

Gdowski AS, Ranjan A, Vishwanatha JK. Current Concepts in Bone Metastasis, Contemporary Therapeutic Strategies and Ongoing Clinical Trials. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36: 1-13

Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Truneh A, Nunès JA, Olive D. Pd-L1 and Pd-L2 Differ in Their Molecular Mechanisms of Interaction with Pd-1. *Int Immunol* 2010; 22: 651-660

Gibellini L, De Biasi S, Porta C, Lo Tartaro D, Depenni R, Pellacani G, Sabbatini R, Cossarizza A. Single-Cell Approaches to Profile the Response to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* 2020; 11: 1-18

Greisen SR, Kragstrup TW, Thomsen JS, Hansen AS, Krishnamurthy A, Hørslev-Petersen K, Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, Østergaard M, Ørnbjerg LM, Junker P, Sharpe AH, Freeman GJ, Annamalai L, Hvid M, Moestrup SK, Hauge EM, Catrina AI, Deleuran B. Programmed Death Ligand 2 - a Link between Inflammation and Bone Loss in Rheumatoid Arthritis. *J Transl Autoimmun* 2020; 3: 1-10

Greisen SR, Kragstrup TW, Thomsen JS, Hørslev-Pedersen K, Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, Østergaard M, Ørnbjerg L, Junker P, Sharpe AH, Freeman GJ, Hvid M, Moestrup SK, Hauge EM, Deleuran B. The Programmed Death-1 Pathway Counter-Regulates Inflammation-Induced Osteoclast Activity in Clinical and Experimental Settings. *Front Immunol* 2022; 13: 1-12

Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol* 2020; 11: 1-8

Hadjidakis DJ, Androulakis, li. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092: 385-396

Harjunpää H, Guillerey C. Tigit as an Emerging Immune Checkpoint. *Clin Exp Immunol* 2020; 200: 108-119

Heymann MF, Brown HK, Heymann D. Drugs in Early Clinical Development for the Treatment of Osteosarcoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; 25: 1265-1280

Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res* 2015; 2015: 1-11

Hiram-Bab S, Liron T, Deshet-Unger N, Mittelman M, Gassmann M, Rauner M, Franke K, Wielockx B, Neumann D, Gabet Y. Erythropoietin Directly Stimulates Osteoclast Precursors and Induces Bone Loss. *FASEB J* 2015; 29: 1890-1900

Hobolt-Pedersen AS, Delaissé JM, Søre K. Osteoclast Fusion Is Based on Heterogeneity between Fusion Partners. *Calcif Tissue Int* 2014; 95: 73-82

Hong S, Youk T, Lee SJ, Kim KM, Vajdic CM. Bone Metastasis and Skeletal-Related Events in Patients with Solid Cancer: A Korean Nationwide Health Insurance Database Study. *PLoS One* 2020; 15: 1-13

Hou A, Hou K, Huang Q, Lei Y, Chen W. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cell, a Promising Strategy to Overcome Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* 2020; 11: 1-19

Hoves S, Ooi CH, Wolter C, Sade H, Bissinger S, Schmittnaegel M, Ast O, Giusti AM, Wartha K, Runza V, Xu W, Kienast Y, Cannarile MA, Levitsky H, Romagnoli S, De Palma M, Rüttinger D, Ries CH. Rapid Activation of Tumor-Associated Macrophages Boosts Preexisting Tumor Immunity. *J Exp Med* 2018; 215: 859-876

Huang JF, Shen J, Li X, Rengan R, Silvestris N, Wang M, Derosa L, Zheng X, Belli A, Zhang XL, Li YM, Wu A. Incidence of Patients with Bone Metastases at Diagnosis of Solid Tumors in Adults: A Large Population-Based Study. *Ann Transl Med* 2020; 8: 1-17

Jansen IDC, Van Velzen T, De Vries TJ, Szulcek R, Van Loon J. Real-Time Quantification of Osteoclastic Resorptive Activity by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10: 1-9

Khair DO, Bax HJ, Mele S, Crescioli S, Pellizzari G, Khiabany A, Nakamura M, Harris RJ, French E, Hoffmann RM, Williams IP, Cheung A, Thair B, Beales CT, Touizer E, Signell AW, Tasnova NL, Spicer JF, Josephs DH, Geh JL, Mackenzie Ross A, Healy C, Papa S, Lacy KE, Karagiannis SN. Combining Immune Checkpoint Inhibitors: Established and Emerging Targets and Strategies to Improve Outcomes in Melanoma. *Front Immunol* 2019; 10: 1-20

Khan S, Gerber DE. Autoimmunity, Checkpoint Inhibitor Therapy and Immune-Related Adverse Events: A Review. *Semin Cancer Biol* 2020; 64: 93-101

Kim B, Cho YJ, Lim W. Osteoporosis Therapies and Their Mechanisms of Action (Review). *Exp Ther Med* 2021; 22: 1-14

Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular Biology of Bone Metastasis. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2609-2617

Korn MF, Stein RR, Dolf A, Shakeri F, Buness A, Hilgers C, Masson W, Gravius S, Kohlhof H, Burger C, Wirtz DC, Randau TM, Schildberg FA. High-Dimensional Analysis of Immune Cell Composition Predicts Periprosthetic Joint Infections and Dissects Its Pathophysiology. *Biomedicines* 2020; 8: 1-17

Lampiasi N, Russo R, Zito F. The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 1-9

Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol* 2020; 10: 1-34

Leddy LR, Holmes RE. Chondrosarcoma of Bone. *Cancer Treat Res* 2014; 162: 117-130

Lei Y, Li X, Huang Q, Zheng X, Liu M. Progress and Challenges of Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade. *Front Oncol* 2021; 11: 1-14

Liao Y, Chen L, Feng Y, Shen J, Gao Y, Cote G, Choy E, Harmon D, Mankin H, Hornicek F, Duan Z. Targeting Programmed Cell Death Ligand 1 by Crispr/Cas9 in Osteosarcoma Cells. *Oncotarget* 2017; 8: 30276-30287

Liu C, Wang M, Xu C, Li B, Chen J, Chen J, Wang Z. Immune Checkpoint Inhibitor Therapy for Bone Metastases: Specific Microenvironment and Current Situation. *J Immunol Res* 2021; 2021: 1-18

Liu J, Xavy S, Mihardja S, Chen S, Sompalli K, Feng D, Choi T, Agoram B, Majeti R, Weissman IL, Volkmer JP. Targeting Macrophage Checkpoint Inhibitor Sirpα for Anticancer Therapy. *JCI Insight* 2020; 5: 1-13

Lizée G, Overwijk WW, Radvanyi L, Gao J, Sharma P, Hwu P. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. *Annu Rev Med* 2013; 64: 71-90

Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, Collier AR, Turley SJ. Regulated Release of Nitric Oxide by Nonhematopoietic Stroma Controls Expansion of the Activated T Cell Pool in Lymph Nodes. *Nat Immunol* 2011; 12: 1096-1104

Lundberg P, Koskinen C, Baldock PA, Löthgren H, Stenberg A, Lerner UH, Oldenborg PA. Osteoclast Formation Is Strongly Reduced Both in Vivo and in Vitro in the Absence of Cd47/Sirpalpha-Interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 444-448

Machado I, López-Guerrero JA, Scotlandi K, Picci P, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical Analysis and Prognostic Significance of Pd-L1, Pd-1, and Cd8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Ewing's Sarcoma Family of Tumors (Esft). *Virchows Arch* 2018; 472: 815-824

Mantovani A, Allavena P. The Interaction of Anticancer Therapies with Tumor-Associated Macrophages. *J Exp Med* 2015; 212: 435-445

Mcberry C, Dias A, Shryock N, Lampe K, Gutierrez FR, Boon L, De'broski RH, Aliberti J. Pd-1 Modulates Steady-State and Infection-Induced Il-10 Production in Vivo. *Eur J Immunol* 2014; 44: 469-479

Moriyama K, Kukita A, Li YJ, Uehara N, Zhang JQ, Takahashi I, Kukita T. Regulation of Osteoclastogenesis through Tim-3: Possible Involvement of the Tim-3/Galectin-9 System in the Modulation of Inflammatory Bone Destruction. *Lab Invest* 2014; 94: 1200-1211

Moseley KF, Naidoo J, Bingham CO, Carducci MA, Forde PM, Gibney GT, Lipson EJ, Shah AA, Sharfman WH, Cappelli LC. Immune-Related Adverse Events with Immune Checkpoint Inhibitors Affecting the Skeleton: A Seminal Case Series. *J Immunother Cancer* 2018; 6: 1-9

Nagahama K, Aoki K, Nonaka K, Saito H, Takahashi M, Varghese BJ, Shimokawa H, Azuma M, Ohya K, Ohyama K. The Deficiency of Immunoregulatory Receptor Pd-1 Causes Mild Osteopetrosis. *Bone* 2004; 35: 1059-1068

Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Nagai A, Yamashita K. Characterization of Bone Mineral-Resembling Biomaterials for Optimizing Human Osteoclast Differentiation and Resorption. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101: 3141-3151

Nakashima T, Takayanagi H. New Regulation Mechanisms of Osteoclast Differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1240: 13-18

Nguyễn MV, Carlier C, Nich C, Gouin F, Crenn V. Fracture Risk of Long Bone Metastases: A Review of Current and New Decision-Making Tools for Prophylactic Surgery. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 1-18

Ocaña-Guzman R, Torre-Bouscoulet L, Sada-Ovalle I. Tim-3 Regulates Distinct Functions in Macrophages. *Front Immunol* 2016; 7: 1-9

Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, Hattori T, Masaki T, Hirashima M. Cell Surface Galectin-9 Expressing Th Cells Regulate Th17 and Foxp3+ Treg Development by Galectin-9 Secretion. *PLoS One* 2012; 7: 1-10

Palmieri DJ, Carlino MS. Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity. *Curr Oncol Rep* 2018; 20: 1-12

Panagopoulos V, Liapis V, Zinonos I, Hay S, Leach DA, Ingman W, Denichilo MO, Atkins GJ, Findlay DM, Zannettino ACW, Evdokiou A. Peroxidase Enzymes Inhibit Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 440: 8-15

Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol* 2019; 40: 310-327

Paydas S, Bagir EK, Deveci MA, Gonlusen G. Clinical and Prognostic Significance of Pd-1 and Pd-L1 Expression in Sarcomas. *Med Oncol* 2016; 33: 1-10

Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras J. Common Signalling Pathways in Macrophage and Osteoclast Multinucleation. *J Cell Sci* 2018; 131: 1-11

Philips EA, Garcia-España A, Tocheva AS, Ahearn IM, Adam KR, Pan R, Mor A, Kong XP. The Structural Features That Distinguish Pd-L2 from Pd-L1 Emerged in Placental Mammals. *J Biol Chem* 2020; 295: 4372-4380

Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology* 2016; 62: 128-137

Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, Lepage P, Boneca IG, Chamaillard M, Kroemer G, Zitvogel L. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* 2016; 44: 1255-1269

Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2018; 378: 158-168

Rameshbabu S, Labadie BW, Argulian A, Patnaik A. Targeting Innate Immunity in Cancer Therapy. *Vaccines (Basel)* 2021; 9: 1-26

Restifo NP, Smyth MJ, Snyder A. Acquired Resistance to Immunotherapy and Future Challenges. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 121-126

Riedel RF, Larrier N, Dodd L, Kirsch D, Martinez S, Brigman BE. The Clinical Management of Chondrosarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 2009; 10: 94-106

Sabbatino F, Liguori L, Pepe S, Ferrone S. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Melanoma. *Expert Opin Biol Ther* 2022; 22: 563-576

Sacidalan DB, Lucero JA. The Association between Inflammation and Immunosuppression: Implications for ICI Biomarker Development. *Onco Targets Ther* 2021; 14: 2053-2064

Saha D, Martuza RL, Rabkin SD. Macrophage Polarization Contributes to Glioblastoma Eradication by Combination Immunovirotherapy and Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Cell* 2017; 32: 1-21

Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy: A Focus on T-Regulatory Cells. *Immunol Cell Biol* 2018; 96: 21-33

Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-Cd28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* 2016; 44: 955-972

Sharma P, Allison JP. The Future of Immune Checkpoint Therapy. *Science* 2015; 348: 56-61

Shen JK, Cote GM, Choy E, Yang P, Harmon D, Schwab J, Nielsen GP, Chebib I, Ferrone S, Wang X, Wang Y, Mankin H, Hornicek FJ, Duan Z. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Osteosarcoma. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 690-698

Shin HH, Kim SJ, Kang SY, Lee DS, Choi HS. Soluble Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Stimulates Osteoclastogenesis by Down-Regulation of Osteoprotegerin in Bone Marrow Stromal Cells. *Bone* 2006; 39: 716-723

Srivastava RK, Dar HY, Mishra PK. Immunoporosis: Immunology of Osteoporosis-Role of T Cells. *Front Immunol* 2018; 9: 1-12

Sun L, Arbesman J, Piliang M. Vitamin D, Autoimmunity and Immune-Related Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors. *Arch Dermatol Res* 2021; 313: 1-10

Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, Yu T. Macrophage-Osteoclast Associations: Origin, Polarization, and Subgroups. *Front Immunol* 2021; 12: 1-15

Sundara YT, Kostine M, Cleven AHG, Bovée JVMG, Schilham MW, Cleton-Jansen A-M. Increased Pd-L1 and T-Cell Infiltration in the Presence of Hla Class I Expression in Metastatic High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for T-Cell-Based Immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2017; 66: 119-128

Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA. De-Novo and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Targeting. *Lancet Oncol* 2017; 18: 731-741

Tai YT, Cho SF, Anderson KC. Osteoclast Immunosuppressive Effects in Multiple Myeloma: Role of Programmed Cell Death Ligand 1. *Front Immunol* 2018; 9: 1-15

Takahashi S. Molecular Functions of Sirp α and Its Role in Cancer. *Biomed Rep* 2018; 9: 3-7

Tas AC, Bhaduri SB. Rapid Coating of Ti6al4v at Room Temperature with a Calcium Phosphate Solution Similar to 10 $\times$ Simulated Body Fluid. *J Mater Res* 2004; 19: 2742-2749

Terashima A, Takayanagi H. Overview of Osteoimmunology. *Calcif Tissue Int* 2018; 102: 503-511

Terpos E, Confavreux CB, Clézardin P. Bone Antiresorptive Agents in the Treatment of Bone Metastases Associated with Solid Tumours or Multiple Myeloma. *Bonekey Rep* 2015; 4: 1-11

Thanindratarn P, Dean DC, Nelson SD, Hornicek FJ, Duan Z. Advances in Immune Checkpoint Inhibitors for Bone Sarcoma Therapy. *J Bone Oncol* 2019; 15: 1-14

Thompson PA, Chintagumpala M. Targeted Therapy in Bone and Soft Tissue Sarcoma in Children and Adolescents. *Curr Oncol Rep* 2012; 14: 197-205

Tian J, Zhang B, Rui K, Wang S. The Role of Gitr/Gitrl Interaction in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2020; 11: 1-7

Torabi A, Amaya CN, Wians FH, Bryan BA. Pd-1 and Pd-L1 Expression in Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Pathology* 2017; 49: 506-513

Uluçkan O, Becker SN, Deng H, Zou W, Prior JL, Piwnica-Worms D, Frazier WA, Weilbaecher KN. Cd47 Regulates Bone Mass and Tumor Metastasis to Bone. *Cancer Res* 2009; 69: 3196-3204

Väänänen K. Mechanism of Osteoclast Mediated Bone Resorption--Rationale for the Design of New Therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 959-971

Van Dam PA, Verhoeven Y, Trinh XB, Wouters A, Lardon F, Prenen H, Smits E, Baldewijns M, Lammens M. Rank/Rankl Signaling Inhibition May Improve the Effectiveness of Checkpoint Blockade in Cancer Treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 133: 85-91

Vivarelli S, Falzone L, Torino F, Scandurra G, Russo G, Bordonaro R, Pappalardo F, Spandidos DA, Raciti G, Libra M. Immune-Checkpoint Inhibitors from Cancer to Covid-19: A Promising Avenue for the Treatment of Patients with Covid-19 (Review). *Int J Oncol* 2021; 58: 145-157

Walsh MC, Takegahara N, Kim H, Choi Y. Updating Osteoimmunology: Regulation of Bone Cells by Innate and Adaptive Immunity. *Nat Rev Rheumatol* 2018; 14: 146-156

Wang DR, Wu XL, Sun YL. Therapeutic Targets and Biomarkers of Tumor Immunotherapy: Response Versus Non-Response. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7: 1-27

Wang DY, Salem J-E, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, Zhao S, Das S, Beckermann KE, Ha L, Rathmell WK, Ancell KK, Balko JM, Bowman C, Davis EJ, Chism DD, Horn L, Long GV, Carlino MS, Lebrun-Vignes B, Eroglu Z, Hassel JC, Menzies AM, Sosman JA, Sullivan RJ, Moslehi JJ, Johnson DB. Fatal Toxic Effects Associated with Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Oncology* 2018; 4: 1721-1728

Wang K, Gu Y, Liao Y, Bang S, Donnelly CR, Chen O, Tao X, Mirando AJ, Hilton MJ, Ji RR. Pd-1 Blockade Inhibits Osteoclast Formation and Murine Bone Cancer Pain. *J Clin Invest* 2020; 130: 3603-3620

Wang X, Yu Y, Ji L, Geng Z, Wang J, Liu C. Calcium Phosphate-Based Materials Regulate Osteoclast-Mediated Osseointegration. *Bioact Mater* 2021; 6: 4517-4530

Weilbaecher KN, Guise TA, Mccauley LK. Cancer to Bone: A Fatal Attraction. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 411-425

Whelan JS, Davis LE. Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Chordoma. *J Clin Oncol* 2018; 36: 188-193

Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, Wang J, Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen JD, Lovelace P, Scheeren FA, Chao MP, Weiskopf K, Tang C, Volkmer AK, Naik TJ, Storm TA, Mosley AR, Edris B, Schmid SM, Sun CK, Chua MS, Murillo O, Rajendran P, Cha AC, Chin RK, Kim D, Adorno M, Raveh T, Tseng D, Jaiswal S, Enger P, Steinberg GK, Li G, So SK, Majeti R, Harsh GR, Van De Rijn M, Teng NN, Sunwoo JB, Alizadeh AA, Clarke MF, Weissman IL. The Cd47-Signal Regulatory Protein Alpha (Sirpa) Interaction Is a Therapeutic Target for Human Solid Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 6662-6667

Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, Clendenin C, Stanger BZ, Furth EE, Wherry EJ, Vonderheide RH. Induction of T-Cell Immunity Overcomes Complete Resistance to Pd-1 and Ctla-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 399-411

Wykes MN, Lewin SR. Immune Checkpoint Blockade in Infectious Diseases. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 91-104

Xiang L, Gilkes DM. The Contribution of the Immune System in Bone Metastasis Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1-21

Xiong H, Mittman S, Rodriguez R, Moskalenko M, Pacheco-Sanchez P, Yang Y, Nickles D, Cubas R. Anti-Pd-L1 Treatment Results in Functional Remodeling of the Macrophage Compartment. *Cancer Res* 2019; 79: 1493-1506

Yao Y, Cai X, Ren F, Ye Y, Wang F, Zheng C, Qian Y, Zhang M. The Macrophage-Osteoclast Axis in Osteoimmunity and Osteo-Related Diseases. *Front Immunol* 2021; 12: 1-17

Zak KM, Grudnik P, Magiera K, Dömling A, Dubin G, Holak TA. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor Pd-1 and Its Ligands Pd-L1/Pd-L2. *Structure* 2017; 25: 1163-1174

Zhang B, Wu Q, Zhou YL, Guo X, Ge J, Fu J. Immune-Related Adverse Events from Combination Immunotherapy in Cancer Patients: A Comprehensive Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Int Immunopharmacol* 2018; 63: 292-298

Zhang Y, Shu T, Wang S, Liu Z, Cheng Y, Li A, Pei D. The Osteoinductivity of Calcium Phosphate-Based Biomaterials: A Tight Interaction with Bone Healing. *Front Bioeng Biotechnol* 2022; 10: 1-9

Zhang Y, Zheng J. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1248: 201-226

Zhao J, Roberts A, Wang Z, Savage J, Ji RR. Emerging Role of Pd-1 in the Central Nervous System and Brain Diseases. *Neurosci Bull* 2021; 1-15

Zhu YJ, Chang XS, Zhou R, Chen YD, Ma HC, Xiao ZZ, Qu X, Liu YH, Liu LR, Li Y, Yu YY, Zhang HB. Bone Metastasis Attenuates Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors and Displays "Cold" Immune Characteristics in Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* 2022; 166: 189-196

2. Veröffentlichungen

2.1 Veröffentlichung 1

 **frontiers** | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 02 February 2023
DOI 10.3389/fimmu.2023.988365



OPEN ACCESS

EDITED BY
Teun J. De Vries,
VU Amsterdam, Netherlands

REVIEWED BY
Ari Elson,
Weizmann Institute of Science, Israel
Marco Ponzetti,
University of L'Aquila, Italy

*CORRESPONDENCE
Frank A. Schildberg
✉ frank.schildberg@ukbonn.de

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 07 July 2022
ACCEPTED 19 January 2023
PUBLISHED 02 February 2023

CITATION

Brom V, Strauss A, Sieberath A, Salber J, Burger C, Wirtz D and Schildberg FA (2023) Agonistic and antagonistic targeting of immune checkpoint molecules differentially regulate osteoclastogenesis. *Front. Immunol.* 14:988365. doi: 10.3389/fimmu.2023.988365

COPYRIGHT

© 2023 Brom, Strauss, Sieberath, Salber, Burger, Wirtz and Schildberg. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Agonistic and antagonistic targeting of immune checkpoint molecules differentially regulate osteoclastogenesis

Victoria C. Brom¹, Andreas C. Strauss¹, Alexander Sieberath², Jochen Salber^{2,3}, Christof Burger¹, Dieter C. Wirtz¹ and Frank A. Schildberg^{1*}

¹Clinic for Orthopedics and Trauma Surgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, ²Department of Experimental Surgery, Centre for Clinical Research, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, Germany, ³Department of Surgery, Universitätsklinikum Knappschafts-Krankenhaus Bochum GmbH, Bochum, Germany

Introduction: Immune checkpoint inhibitors are used in the treatment of various cancers and have been extensively researched with regard to inflammatory and autoimmune diseases. However, this revolutionary therapeutic strategy often provokes critical auto-inflammatory adverse events, such as inflammatory reactions affecting the cardiovascular, gastrointestinal, nervous, and skeletal systems. Because the function of these immunomodulatory co-receptors is highly cell-type specific and the role of macrophages as osteoclast precursors is widely published, we aimed to analyze the effect of immune checkpoint inhibitors on these bone-resorbing cells.

Methods: We established an *in vitro* model of osteoclastogenesis using human peripheral blood mononuclear cells, to which various immune checkpoints and corresponding antagonistic antibodies were administered. Formation of osteoclasts was quantified and cell morphology was analyzed *via* immunofluorescence staining, cell size measurements, and calculation of cell numbers in a multitude of samples.

Results: These methodical approaches for osteoclast research achieved objective, comparable, and reproducible results despite the great heterogeneity in the form, size, and number of osteoclasts. In addition to the standardization of experimental analyses involving osteoclasts, our study has revealed the substantial effects of agonistic and antagonistic checkpoint modulation on osteoclastogenesis, confirming the importance of immune checkpoints in bone homeostasis.

Discussion: Our work will enable more robust and reproducible investigations into the use of immune checkpoint inhibitors in conditions with diminished bone density such as osteoporosis, aseptic loosening of endoprostheses, cancer, as well as the side effects of cancer therapy, and might even pave the way for novel individualized diagnostic and therapeutic strategies.

KEYWORDS

immune checkpoint molecules, osteoclasts, osteolysis, osteoporosis, endoprosthesis loosening, cancer, osteoimmunology, musculoskeletal immunology

Introduction

Conditions characterized by an imbalance in bone homeostasis cause a great deal of suffering for patients. Unfortunately, it is not fully known what causes the dysregulation of osteoclasts (OCs) and osteoblasts (OBs), which leads to impaired bone quality. The current diagnostic and therapeutical management for diseases such as osteoporosis, aseptic loosening of endoprostheses, and certain cancers is insufficient. However, there is evidence about underlying osteoimmunological mechanisms that are immensely relevant in development of osteoporotic conditions and skeletal fractures (1–7).

Immune checkpoint molecules represent promising immunological targets in a number of disease settings, and are widely expressed on multiple cell types. They function as secondary regulators for communication between antigen-presenting cells (APCs) and T cells, that is crucial for sufficient immune responses to pathogenic cells. Interestingly, immune checkpoints modulate this interaction not only as co-stimulatory but also as co-inhibitory receptors (8, 9). Administration of inhibitory antibodies targeting such immune checkpoint molecules leads to improved immune activation against various cancers and other diseases (10–12) rather than direct elimination of pathogens (13–16). Stimulatory and inhibitory checkpoint molecules can both be either strengthened or suppressed, resulting in a complex immunoregulatory concept.

Consequently, broad spectrum immune checkpoint inhibitors (ICI) are already successfully used in treatment of various cancers (17, 18), however, patients present side effects arising from excessive autoimmunity and the induction of inflammatory adverse events (19–22). Incidence and severity of such side effects vary considerably depending on the disease, the targeted checkpoint molecule, the applied concentration, single or combined application and patient constitution (20, 21, 23–26). Still, ICI represents a highly potent approach particularly for cancer diseases, that offers immense value for patients and could merely be optimized by amelioration of adverse event occurrence. For this reason, increasing studies suggest the use of cell-type specific checkpoint modulation, as such an approach not only provides more effective immunity against the specific disease but is also more likely to minimize immune-related side effects (27–29).

It has been shown that checkpoint molecules regulate myeloid cells (30–33). Myeloid cells such as monocytes and macrophages are promising targets for the treatment of cancer, as well as infectious and autoimmune diseases. Some of these diseases are caused by low levels of checkpoint protein expression, instead of checkpoint overexpression, meaning that stimulation with agonistic antibodies represents a promising therapeutical approach (19). Monocytes and macrophages also play a critical role in bone homeostasis as they function as precursor cells for OC maturation. We thus sought to examine the influence of various immune checkpoint proteins and their antagonistic antibodies on osteoclastogenesis to assess whether and which checkpoint molecules alter OC differentiation and may be responsible for OC overactivation that ultimately disrupts bone homeostasis. In this regard, some results for few checkpoint molecules are already published, however, mostly describe controverse findings.

Our primary study goal was therefore to gain a deeper understanding of bone homeostasis regulation and elucidate

whether and how immune checkpoint pathways could be exploited to improve the diagnosis and treatment of conditions that lead to bone loss.

Materials and methods

OC differentiation

In preparation for the differentiation of osteoclasts, purification of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed. Whole blood samples were collected in lithium heparin tubes (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany), diluted with equal amounts of phosphate buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and gently added to the same volume of BioColl (Bio & Sell, Feucht, Germany) in a 50-mL Falcon tube. The tubes were then centrifuged (800 g, 4°C, 25 min, brake off). The interphase cell layer was transferred to a new 50-mL Falcon tube and resuspended in enough PBS (4°C) to fill the tube, prior to being centrifuged again (800 g, 4°C, 15 min, brake on). After discarding the supernatant, the cell pellet was washed twice with PBS and centrifuged (230 g, 4°C, 5 min, brake on). Subsequently, the resulting cell pellet was resuspended in Minimum Essential Medium α (MEM α ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2 g/L HEPES (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), 1% L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% penicillin-streptomycin (PS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cell suspension was then plated into 12-well Ibidi slides at 500,000 cells per well (0.56 cm², removable silicon chamber, Ibidi, Gräfelfing, Germany). Differentiation of mature OCs was initiated on day 2 by adding 50 ng/mL M-CSF, 50 ng/mL RANK-Ligand (RANKL; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), and 10 nM 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to the standard medium. Differentiation medium was changed every 48 – 72h. On day 2, the reagents indicated in [Supplementary Table 1](#) were added to the differentiation medium for investigation of their effects on osteoclastogenesis as well as with every further medium change. Additional control experiments were performed using application of non-binding unspecific antibodies and proteins to ensure validity of the non-treated OC control ([Supplementary Figure 1](#)). The ethics committee of the University of Bonn, Germany, approved the study (approval code 283/21), which was conducted according to the approved guidelines and the Helsinki Declaration.

Validation of OC differentiation

On day 14 of OC culture, cells were fixed using paraformaldehyde 4% (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Immunofluorescence staining was performed to evaluate the morphology of OCs and validate the method used for OC differentiation. Therefore, the cells were permeabilized using 0.1% Triton-X 100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a blocking reagent. To categorize the

cells into different stages of osteoclastogenesis, we used the following reagents: an OC-specific polyclonal anti-human Calcitonin Receptor (CT-R) antibody (Biozol, Eching, Germany) and a recombinant anti-TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) antibody (Abcam, Cambridge, UK) to stain OC and OC precursors; the Phalloidin-iFluor 594 Reagent (Abcam, Cambridge, UK) for detecting actin filaments in the cytoskeleton; and DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for staining cell nuclei. TRAP⁺ cells with less than three nuclei were considered as OC precursor cells, whereas cells that were TRAP⁺ CalcR⁺ with three or more nuclei were defined as mature OCs.

TRAP staining

After verifying OC morphology, TRAP staining was performed on day 14 of OC differentiation to identify mature OCs and OC precursor cells. Therefore, the fixed cells were washed twice with PBS and incubated with TRAP buffer (pH 5; distilled water containing 6.56 g/L sodium acetate, AppliChem, Darmstadt, Germany; 23 g/L sodium tartrate dihydrate, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 10 minutes. After another wash step, the cells were incubated with the TRAP staining solution (distilled water containing 0.1 g/L Naphtol aminoacid-MX phosphate, AppliChem, Darmstadt, Germany; 10 mL/L N,N-Dimethylformamide, AppliChem, Darmstadt, Germany; 0.6 g/L Fast Red Violet LB salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 2 hours. After a final washing step with PBS, cover slides were applied.

Quantitative and qualitative analysis of osteoclastogenesis

For the extensive evaluation of osteoclastogenesis on application of various checkpoint modulators (proteins, antibodies, and small molecule inhibitors), we utilized the Olympus microscope IX81 and cellSens Dimension software (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan). Pictures were taken at 4x magnification for whole-well analysis and at 10x magnification for detailed assessments. Images taken at different magnifications were used to assess the degree of OC differentiation for each treatment condition and cell donor.

Using the cellSens Dimension software, the average size of TRAP⁺ cells was analyzed in six squares (each measuring 1 mm²) by automatic quantification of the area taken up by TRAP⁺ cells divided by the number of TRAP⁺ cells. This method was used for the initial examination of OC differentiation as mature OCs are typically larger than their precursor cells. Further, the number of all TRAP⁺ cells was counted manually in the same six squares and classified into precursor cells (< 3 nuclei), small (3 – 10 nuclei) or giant (> 10 nuclei) OCs. In addition, the total number of OCs (> 3 nuclei) per square was assessed. Moreover, the percentage change in the TRAP⁺ cell area as well as the OC cell number was evaluated between different treatment conditions and compared to the control group. Lastly, the percentage of giant OCs was calculated to examine whether a specific OC population was predominantly responsible for causing changes in the total OC number.

OC lysis activity

For generation of functional data, PBMCs were isolated as described above and the cell pellet was resuspended in MEM α containing 20% heat-inactivated FBS, 2 g/L HEPES, 1% L-glutamine, 1% PS and 30 ng/mL M-CSF for pre-differentiation. After 7 days, the OC precursors were trypsinized and seeded into 96-well plates at 30,000 cells per well. Based on a protocol by Tas and Bhaduri (34), the wells were coated with bonelike apatitic calcium phosphate. Differentiation of mature OCs was started by adding 30 ng/mL M-CSF and 60 ng/mL RANKL to the standard medium. The reagents indicated in [Supplementary Table 1](#) were added to the differentiation medium for investigation of their effects on OC activity. Differentiation medium was changed every 48 – 72 h.

After 9 days, von Kossa staining was performed to stain the remaining bonelike coating for analysis of the OC lysis activity. Therefore, the cells were treated with a 1M sodium hypochlorite solution (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and washed twice with PBS, followed by incubation with 5% AgNO₃ (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). After washing, sodium carbonate formaldehyde solution (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was applied, followed by washing with water and neutralization with 5% sodium thiosulfate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). After a final washing step, 100% ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was utilized for dehydration.

Pictures of the wells were taken at 10x magnification using the Olympus microscope IX81 and cellSens Dimension software. The remaining bonelike coating was analyzed in seven squares (each measuring 1mm²) by automatic area quantification and the actual OC resorption then calculated.

Statistical analysis

All data were processed using Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), and GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was utilized for statistical analysis. The D'Agostino-Pearson test or graphical analysis was performed to assess normality in all measured values. Statistical significance of the differences among all groups was evaluated using a one-way ANOVA. The level of significance was set at $P < 0.05$ (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001).

Multiple analysis squares were assessed per well and examined as individual results due to substantial heterogeneity in OC culture, not merely in between experiments and donors but also in single wells. Considering these results as independent findings rather than technical replicates respects the dispersion of data and ensures exact statistical examinations, as published elsewhere (35, 36).

Results

Systematic approach to OC quantification and structured analysis

In this study, we analyzed the effects of selected immune checkpoint proteins and their corresponding antibodies on

osteoclast biology. The exact methodical approach consisted of OC induction from isolated PBMCs, followed by treatment with checkpoint-targeting reagents. On day 14, cells were fixed and analyzed for the expression of TRAP (Supplementary Figure 2A; Figure 1; Supplementary Figure 5). Immunofluorescence staining was subsequently performed to evaluate OC and OC precursor morphology (Supplementary Figure 2B). Such verification was essential as TRAP⁺ cells have a remarkable degree of heterogeneity in form, size, and the number of nuclei.

To generate highly reliable and representative data, we analyzed multiple complete wells, containing cells from different donors, in various experiments. First, images of culture wells, captured at a lower magnification, were used to provide a general overview. Next, detailed examinations were performed manually using images taken at a higher magnification. Although this manual approach was rather time-consuming, it generated precise results as numerous single values were surveyed and enabled an accurate analysis of various different treatment conditions. This approach respects the statistically relevant data distribution that can not only be detected in between experiments and donors but especially in each well of OC culture, hence, the analysis squares are examined as independent findings to further avoid study bias.

Average size of TRAP⁺ cells

At first, the average surface taken up by a TRAP⁺ cell following induction was analyzed. We therefore measured the area taken up by all TRAP⁺ cells in multiple squares per culture well and divided this value by the cell number. The underlying idea was that the size of such cells—either OCs or OC precursors—correlates with the degree of OC differentiation, because OCs tend to be bigger than OC precursors. Also, OC size does not differ significantly and shows similar variability between all applied treatments tested in this study. Hence, surface area examination enables us to gain an overview of variations in TRAP⁺ cell size caused by specific checkpoint inductions, that could indicate how cells during OC differentiation were affected in comparison to the control and also to the corresponding protein or antibody.

The average size of a TRAP⁺ cell in the control group was 2669 μm^2 . All comparisons for the group of PD-1 related checkpoints (Figure 2A) were significant. The PD-1 protein, PD-L1 protein, and PD-L2 antibody all caused an increase in cell size, with the largest size being attributed to OCs stimulated with the PD-L1 protein (4064 μm^2 per cell). Treatment with the PD-1 protein and the PD-L2 antibody resulted in almost equal average cell sizes of 3532 μm^2 and 3573 μm^2 , respectively. A decrease in the average cell size of TRAP⁺ cells could be observed following treatment with the PD-1 antibody, PD-L1 antibody, PD-L2 protein, and DPPA-1, the latter of which was associated with the greatest cell size reduction (981 μm^2).

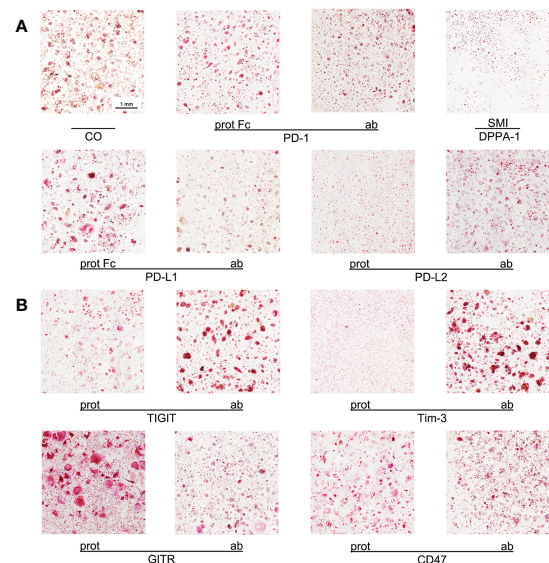


FIGURE 1
Imaging of OC differentiation under different treatment conditions. Representative images (captured at 10x magnification) of OC differentiation on day 14 after induction with different checkpoint modulators. (A) Group of PD-1-related checkpoint molecules. (B) Group of checkpoint molecules that are not yet approved for clinical use. CO, control group; prot, protein; ab, antagonistic antibody; PD-1, programmed cell death protein 1; SMI, small molecule inhibitor; PD-L1, programmed cell death 1 ligand 1; PD-L2, programmed cell death 1 ligand 2; TIGIT, T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains; Tim-3, T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; GITR, glucocorticoid-induced TNFR-related protein; CD, cluster of differentiation.

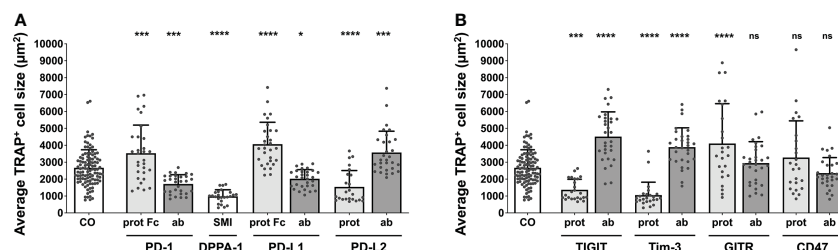


FIGURE 2
Assessment of average TRAP⁺ cell size under different treatment conditions. Average size of TRAP⁺ cells calculated in the six squares (each measuring 1 mm²) per culture well. (A) Group of PD-1-related checkpoint molecules. (B) Group of checkpoint molecules that are not yet approved for clinical use. Each data point represents the mean TRAP⁺ cell size, analyzed in a square of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , *** < 0.001 , **** < 0.0001 ; ns, non-significant). All data is acquired from at least 3 independent experiments, each with a minimum of 2 donors.

For nivolumab, a significant decrease in the average TRAP⁺ cell size was detected at concentrations of 10 µg/mL (1603 µm²) and 100 µg/mL (1446 µm²) (Supplementary Figure 6A).

Concentrating on the remaining molecules (Figure 2B), the greatest increase in the cell size of TRAP⁺ cells to 4516 µm² was registered for TIGIT antibody, followed by GITR protein (4106 µm²) and Tim-3 antibody stimulation (3894 µm²). In contrast, a significant decrease in average cell size was seen for the TIGIT protein (1369 µm²) and the Tim-3 protein (1057 µm²). Treatment with the GITR and CD47 antibodies as well as the CD47 protein did not lead to any significant changes in cell size (2947 µm², 2357 µm² and 3278 µm², respectively).

These initial results highlighted the influence of various checkpoint molecules on OC differentiation. Interestingly, treatment with checkpoint proteins induced opposing outcomes to that of their corresponding antibodies, which was also applicable for the reagent DPPA-1, as an antagonist of both PD-1 and PD-L1.

Percentage changes in the average size of TRAP⁺ cells

To further develop our analysis of the average surface area taken up by a TRAP⁺ cell under tissue culture conditions, percentage changes were calculated to determine the impact of various checkpoint modulators on osteoclastogenesis. Such relative changes are utilized for ease of comparability, as OCs are generally bigger than their precursors, allowing the assumption that an increase in cell size correlates with TRAP⁺ cell number.

With the size change for control inductions at 1.46%, augmentation of osteoclastogenesis was represented by higher percentual values. For the PD-1-associated group (Supplementary Figure 3A), the strongest effect was measured for the PD-L1 protein (+95.36%), followed by the PD-1 protein with an increase of +68.2%. A negative effect on cell size was induced by DPPA-1 (-50.83%) as well as the PD-L2 protein (-31.85%). PD-1, PD-L1 and PD-L2 antibodies led to non-significant findings (-17.72%, -2.83%, 14.05%, respectively). A considerable decrease in cell size was also caused by nivolumab when used at 10 µg/mL (-34.95%) and 100 µg/mL (-38.9%; Supplementary Figure 6B).

For the second checkpoint modulator group (Supplementary Figure 3B), the highest positive percentual change was seen for the GITR protein, which almost doubled the TRAP⁺ cell size (+95.63%), followed by the CD47 protein and the TIGIT antibody. In contrast, the maximal negative effect was caused by Tim-3 protein stimulation (-44.33%). Non-significant changes could be seen for treatment with the TIGIT protein and the Tim-3, GITR and CD47 antibodies.

Quantifying total OCs

In an effort to validate our previous analyses, the total number of OCs was counted manually for each treatment condition. Due to high variability in total cell number per induction well, we chose to utilize the percentage of osteoclasts within the total TRAP⁺ cell population. In the PD-1-related induction conditions (Figure 3A), each effect was

highly significant (reaching levels of $P < 0.0001$), compared to the control (23.71% OCs). The highest number of OCs (36.61%) was seen for the PD-L2 antibody, followed by the PD-L1 protein (32.96%), and the PD-1 protein (30.97%). Checkpoint inductions causing very similar reductions in OC number were the PD-1 antibody (12.66%), the PD-L1 antibody (16.28%), and the PD-L2 protein (13.83%). The absolute lowest OC number was measured for the DPPA-1 condition (1.53%). Reduced OC numbers were also found in the wells treated with nivolumab at 10 µg/mL (9.9%) and 100 µg/mL (5.7%), both highly significant in comparison to the control group (Supplementary Figure 7A).

Remarkably significant changes in OC number were also seen in wells treated with the second checkpoint modulator group (Figure 3B), most reaching very high levels of significances ($P < 0.0001$). Inductions causing an increase in absolute OC numbers were the TIGIT and Tim-3 antibodies as well as the GITR and CD47 proteins. GITR protein induction had the most positive effect on OC number (43.51% OCs), although treatment with the TIGIT antibody (43.83%), the Tim-3 antibody (43.31%) and the CD47 protein (42.73%), resulted in very similar values. Reduction in OC number was noticed following stimulation with the Tim-3 protein (10.35% OCs) or the TIGIT protein (12.2%). Very subtle, non-significant effects were recognizable for the GITR and CD47 antibody inductions (24.63% and 22.75% OCs, respectively).

Overall, the effect of each checkpoint molecule on osteoclastogenesis could be confirmed by changes in OC number. Treatment of cells with the GITR and CD47 antibodies did not significantly change OC number compared to the control, although, they did lower OC numbers considerably in relation to their corresponding proteins.

Percentage changes in total OC number

Continuing our analysis of total OC numbers, percentage changes were determined for ease of comparison to the control group (+0.15%) and assessment of checkpoint-specific effects on osteoclastogenesis. Higher percentual changes represented an increase in osteoclastogenesis. Among the PD-1-related inductions, the strongest effect was recognized for PD-L1 (+53.43%; Supplementary Figure 4A). A decrease in OC number was caused by the PD-L2 protein, the PD-1 and PD-L1 antibodies. As an inhibitor of the PD-1/PD-L1 interaction, DPPA-1 exhibited the highest overall reduction in OCs (-91.7%). The PD-1 antibody and the PD-L2 protein induced a rather moderate decrease in OC number (-39.51% and -40.28%, respectively). Moreover, a negative percentual change was caused by nivolumab at 10 and 100 µg/mL (-49.59% and -69.81%, respectively; Supplementary Figure 7B).

In the second checkpoint group (Supplementary Figure 4B), an increase in total OC numbers was caused by the TIGIT and Tim-3 antibodies, and the GITR and CD47 proteins (all resulted in an increase of at least +50%). The GITR protein was responsible for the most marked increase in total OC number (+67.99%). In contrast, the Tim-3 and TIGIT proteins reduced OC numbers (-61.59% and -51.98%, respectively). Non-significant reduction could be seen for the GITR and CD47 antibodies.

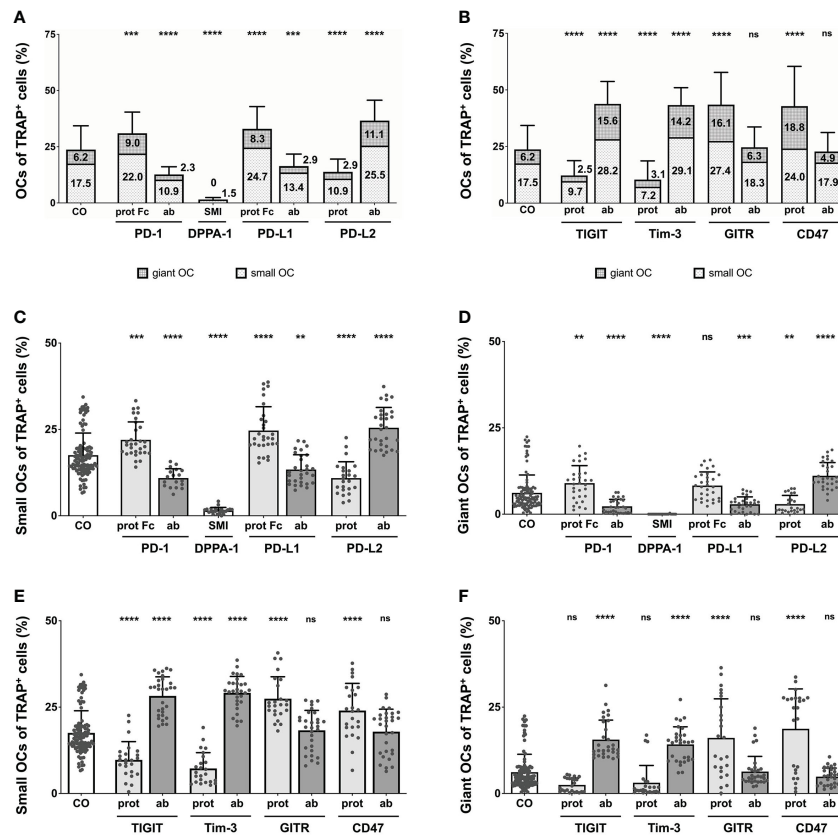


FIGURE 3

Analysis of the proportions of OCs of TRAP⁺ cells under various treatment condition. (A, B) OCs of TRAP⁺ cells as counted in the six squares (each measuring 1 mm²) per culture well. Columns are made up of the proportions of small OCs (TRAP⁺, 3 – 10 nuclei) and giant OCs (TRAP⁺, >10 nuclei) and labelled with the percentual values, respectively. Significance and standard deviation bars refer to the proportion of total OCs. (C, E) Small OCs and (D, F) giant OCs were counted separately in each square. Significance and standard deviation bars refer to proportions of small and giant OCs, respectively. Each data point represents the percentage of (A, B) all, (C, E) small, (D, F) giant OCs of TRAP⁺ cells, analyzed in a square of 1mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001 ; ns, non-significant). All data is acquired from at least 3 independent experiments, each with a minimum of 2 donors.

Lysis of bonelike coating

Further investigating these findings, the influence of both checkpoint groups on the functional activity of OCs was examined and lysis of a bonelike apatitic calcium phosphate coating (Supplementary Figure 8A) was quantified. Compared to the control group at 46.57%, higher percentual values symbolize increased functional activity of OCs. In the PD-1-related checkpoint group (Supplementary Figure 8B), the significantly highest OC activity could be found for PD-L1 protein (90.23%), whereas significantly reduced resorption was caused by the PD-1 antibody (20%) and the lowest lytic activity could be seen for DPPA-1 at only 0.04%. Non-significant effects were detected after application of PD-1 and PD-L2 proteins, PD-L1 antibody as well as the PD-L2 antibody, the latter presenting a non-statistically significant trend at 70.81% lysed coating.

For the second checkpoint group (Supplementary Figure 8C), TIGIT and Tim-3 antibodies increased the OC activity significantly (76.85% and 75.89%, respectively). In contrast, GITR antibody diminished the lysis activity significantly (18.41%). All applied

checkpoint proteins and the CD47 antibody induced non-significant findings.

Quantifying small and giant OCs

To validate our previous results, we counted the number of small and giant OCs in our cultures. In this study, small OCs were considered as TRAP⁺ cells with 3 – 10 nuclei, whereas giant OCs were TRAP⁺ and had 10 or more nuclei per cell. This separation between small and giant OCs was intended to determine whether one of these OC subtypes was responsible for the changes in total OC number.

For the control group, the level of small OCs was at 17.54%, whereas giant OCs made up 6.17% of the TRAP⁺ cells. Focusing on PD-1-related inductions (Figures 3C, D), the overall trend seen for total OC numbers was very similar for the numbers of small and giant OCs. Examining small OCs (Figure 3C), the PD-L2 antibody induced the largest number of small OCs (25.49% of TRAP⁺ cells), closely followed by the PD-L1 protein (24.67%) and the PD-1 protein. A negative effect

on the number of small OCs was detected for the PD-1 and PD-L1 antibodies, the PD-L2 protein, and DPPA-1 (1.51% small OCs). Regarding giant OCs (Figure 3D), the effects were equal for each induction compared to the numbers of small OCs. The maximal number of small OCs was induced by the PD-L2 antibody (11.12%), followed by the PD-1 protein (8.99%), whereas the minimal number was observed for DPPA-1 (0.01%). Further significant reduction (compared to the control) could be seen for the PD-1 and PD-L1 antibodies (2.27% and 2.88%, respectively) as well as the PD-L2 protein (2.92%). Small OCs were significantly reduced following treatment with 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nivolumab (8.21% and 4.5%, respectively; Supplementary Figure 7C). In addition, a highly significant decrease in giant OCs was detectable at 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nivolumab (1.66% and 1.22%, respectively; Supplementary Figure 7D).

Concentrating on the second group of OC inductions (Figure 3E, F), the previously recognized trend was also mostly followed. Positive effects on the number of small OCs (Figure 3E) were seen for stimulation with the TIGIT and Tim-3 antibodies, as well as the GITR and CD47 proteins. Maximal small OC numbers were seen for the Tim-3 antibody condition (29.12%) and minimal for the Tim-3 protein (7.24%). GITR and CD47 antibodies did not follow the overall trend as only slight, non-significant increases in the number of small OCs (18.29% and 17.89%, respectively) were registered. The TIGIT and Tim-3 antibodies, and the GITR and CD47 proteins were better at inducing giant OC numbers with the maximum number of giant OCs observed for CD47 protein condition (18.73%; Figure 3F). In contrast, TIGIT protein application showed a non-significant trend for reducing the giant OC number to 2.48%.

Proportion of giant OCs within the total OC number

Completing the analysis of the effects exerted by checkpoint modulators on OC differentiation, the percentage of giant OCs within the total OC number was calculated. In the control group, giant OCs made up 18.69% of all OCs. Starting with the PD-1-related checkpoint modulators (Figure 4A), the highest proportion of giant OCs was seen in wells treated with the PD-L2 antibody (22.91%),

which represented a significant increase compared to the control. The smallest composition of giant OCs was identified in the DPPA-1-treated wells (0.77%). Other conditions that showed a relevant reduction in the proportion of giant OCs were the PD-L1 antibody (13.76%) and the PD-1 antibody (13.24%). Treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nivolumab resulted in significantly lower percentages of giant OCs (12.33%; Supplementary Figure 9). Insignificant changes were found for the PD-1, PD-L1 and PD-L2 proteins (20.9%, 19.25% and 15.52%, respectively).

Focusing on the second checkpoint group (Figure 4B), maximal giant OC percentages were elicited by the CD47 protein (26.74%), followed closely by the TIGIT antibody (25.77%), the Tim-3 antibody (24.1%), and the GITR protein (23.44%); all these changes were statistically significant. The proportion of giant OCs did not result in statistically relevant changes relative to the control when induced with the TIGIT protein (15.35%), the Tim-3 protein (16.79%), or the GITR (19.41%) and CD47 antibodies (17.07%).

Generally, both subgroups of OCs (small vs. giant) showed similar perturbations in number under most conditions, as could have already been assumed from prior analyses. It became further apparent that for every induction condition tested, giant OCs made up the unmistakable minority of all OCs. Therefore, changes in the total number of OCs were primarily caused by alterations in the quantity of small OCs.

In conclusion, all analyses that were performed to investigate the effects of checkpoint proteins and their antagonistic antibodies on osteoclast biology showed consistent results. The combination of data obtained from the comparison of average TRAP⁺ cell sizes and functional OC activity as well as the analysis of OC numbers, demonstrated that osteoclastogenesis is sensitive to checkpoint modulation. Furthermore, we are able to categorize our findings into two overarching groups: 1) Checkpoint modulators that had a positive effect on osteoclastogenesis, namely, PD-1 and PD-L1 proteins, the PD-L2 antibody, the TIGIT and Tim-3 antibodies, as well as the GITR and CD47 proteins; and 2) Corresponding antibodies or checkpoint proteins that caused negative effects on osteoclastogenesis, namely, the PD-1 and PD-L1 antibodies, DPPA-1, the PD-L2, TIGIT, and Tim-3 proteins, as well as the GITR and CD47 antibodies (Figure 5).

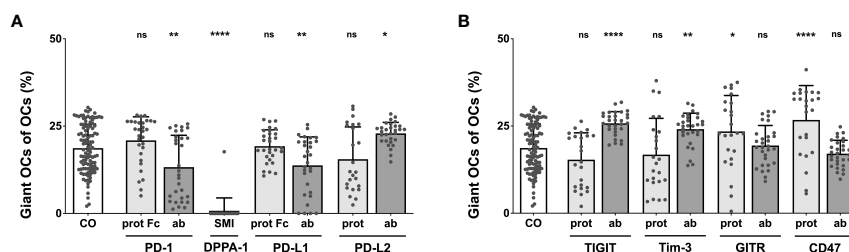
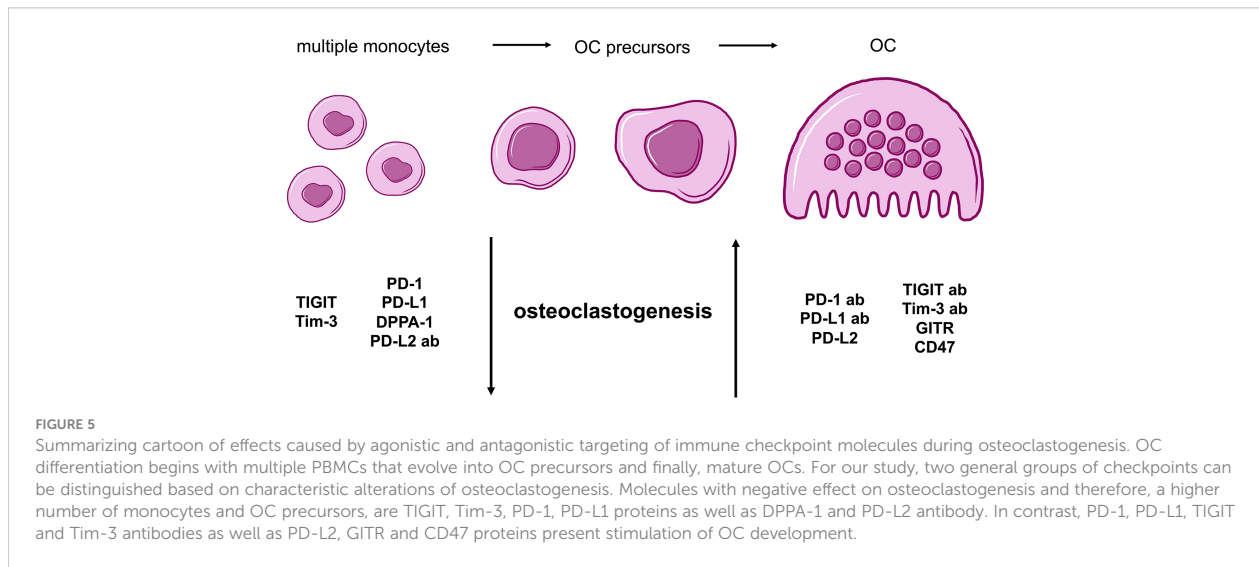


FIGURE 4

Analysis of the percentage of giant OCs that make up total OC numbers. Giant OCs make up a significant proportion of total OC. As all inductions are well below 50%, alterations in total OC number are mostly due to changes in the number of small OCs. (A) Group of PD-1-related checkpoint molecules. (B) Group of checkpoint molecules that are not yet approved for clinical use. Each data point represents the percentage of giant OCs of the total OC number, analyzed in a square of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.0001 ; ns, non-significant). All data is acquired from at least 3 independent experiments, each with a minimum of 2 donors.



Discussion

Results obtained in this study enabled the categorization of checkpoint modulators in two groups that influence osteoclastogenesis differently. In this regard, we found PD-1, PD-L1, GITR, and CD47 proteins to be OC stimulatory, whereas, PD-L2, DPPA-1, TIGIT, and Tim-3 showed inhibitory effects on osteoclastogenesis. The corresponding antagonistic antibodies caused contrary results (Figure 5).

PD-1

Our examinations showed an increase in osteoclastogenesis and in the size of OCs and OC precursors after application of the PD-1 protein. It is widely accepted to compare bone resorption by OCs (as professional phagocytes) to macrophage phagocytosis during pro-inflammatory M1 polarization (37–40). Such consideration is even more reasonable owing to PD-1 being significantly upregulated in PBMCs of patients suffering from postmenopausal osteoporosis, which represents an imbalance in the OC/OB activity ratio and further correlates with elevated C-reactive protein (CRP) levels (2). Hence, PD-1 is thought to favor OC maturation not only *via* the inhibition of osteoblastic bone formation but also by upregulating OC activity as well as inflammatory mediators (2). Moreover, overactive OCs have been detected following PD-1 pathway stimulation (41). Thus, raised PD-1 levels are thought to represent ongoing inflammatory immunity, which favors bone degradation and clinically correlates with osteoporosis (42). However, inhibition of PD-1 signaling in a murine bone cancer model resulted in less bone destruction (43), leading to the assumption that overstimulating the PD-1 pathway might lead to the development of an osteoporotic bone condition due to OC activation. As could be expected, administration of an inhibitory PD-1 antibody led to significantly reduced levels of OC formation and size, in our study. Findings of osteopetrosis in mice after PD-1-ICI and genetic knockout (2, 44) support our results of impaired OC activation after PD-1 blockade.

Controversially, there is some evidence of PD-1 deficiency causing osteoporosis. A higher risk of fracture was reported after anti-PD-1 therapy (1). However, owing to only six patients being included in this particular study, findings may have been coincidental. A reduction in trabecular bone volume and evidence of a weakened microstructure due to increased RANKL production were described in a murine model (42). However, the study's authors ultimately agreed on the essentiality of the PD-1 signaling pathway for regulating osteoclastogenesis and maintaining optimal bone structure and density.

PD-L1

PD-L1, as a ligand of PD-1, participates in the PD-1 pathway, which is immensely important for bone homeostasis. Similarly to PD-1, we found that induction with PD-L1 increased OC size and number *in vitro*, albeit, to a lesser extent than its receptor. In contrast, the PD-L1 antibody reduced OC formation, again less strongly than the PD-1 antibody. Considering that OC activation might be comparable to the activation of immune cells, published results are not in agreement with our findings, as PD-L1 T cells promote transition to the immunosuppressive M2 profile similar to what is seen regarding PD-1 and its influence on macrophages (45). In line with these results, anti-PD-L1 therapy is reported to favor the pro-inflammatory M1 macrophage phenotype (46, 47). However, these findings were obtained using T cells and macrophages, which due to particular dissimilarities with OCs, are not readily applicable to our study design.

In our study, the effect of the inhibitory PD-L1 antibody on osteoclastogenesis was reproduced by application of nivolumab, another anti-PD-L1 modulator. It even became apparent that the blockade of osteoclastogenesis caused by nivolumab was dose-dependent, ultimately suggesting that PD-L1 application indeed favors osteoclastogenesis whereas the inhibition of PD-L1 results in a reduction in OC size and number.

PD-L2

In contrast to PD-1 and PD-L1, PD-L2 reduced the quantity of newly formed OCs whereas the corresponding antagonistic antibody increased osteoclastogenesis. Hence, the actions of this second PD-1 ligand highlight the alternate functions of the PD-1 pathway. These findings are in line with a study published by Greisen et al., who found that PD-L2 inhibited TRAP activity in RANKL- and MCSF-stimulated cultures as well as reduced the activity and development of ACPA-dependent OCs on synthetic calcium phosphate-coated plates, while not having any effect on OBs (48). Likewise, mice deficient in PD-L2 were associated with diminished bone density and impairments in bone microstructure (48), thus supporting our *in vitro* results.

PD-1-associated molecules

Comparing all the modulators of the PD-1 pathway examined in this study, it becomes apparent that the antagonistic PD-1 antibody showed a stronger negative influence on OCs than the PD-L1 antibody, whereas the proteins presented caused contrary effects. The inhibitory effect of PD-L2 could have been expected to dominate when only PD-L1 was blocked and therefore, osteoclastogenesis to be even more restricted compared to PD-1 blockade. As this was not the case, it seems plausible that other ligands or co-factors influence the regulation of OCs by the PD-1 family. Reciprocal interactions of PD-1 and its ligands can also be imagined, as these might be interrupted by PD-L1 blockade and thus, inhibitory effects were not as strong as could have been anticipated.

Reciprocal effects generated by the PD-1 ligands can be explained by a multitude of different factors. First, PD-L1 is widely expressed on hematopoietic and non-hematopoietic cells, whereas expression of PD-L2 is restricted to APCs, as, e.g., dendritic cells, macrophages, monocytes and some B cells (49, 50). It is unclear whether, and if so, how, this influences effects on OCs (51), however, it can be imagined that PD-L1 improves osteoclastogenesis in early phases in contrast to PD-L2 that might alter OC generation in later stages. Further, both ligands compete for binding and present majorly different molecular interaction with PD-1 (52). PD-L1 shows poor affinity to PD-1 due to rapid biphasic dissociation and lack of conformation change for efficient interaction (52). PD-L2 however fits much better to PD-1 and binds 3x stronger, this is attributed to a PD-L2-specific “latch” supposed to improve PD-1-PD-L2 binding (49) as well as to modification of the binding cavity in PD-1 after PD-L2 binding (50). Also, PD-L2 presents constant dissociation from PD-1 and could therefore outcompete PD-L1 effects (51, 52), resulting in inhibition of osteoclastogenesis. Be that as it may, both PD-1 ligands are able to hinder binding of the other ligand dose-dependently (49, 52), hence, this topic should be researched further.

Despite this, the inhibitory effects of PD-L1 inhibition were confirmed using nivolumab, which resulted in a similar reduction in osteoclastogenesis, as reflected by lower OC number and size. Moreover, DPPA-1, as a potent inhibitor of the PD-1/PD-L1 interaction showed the strongest negative effect on OC maturation and thereby verified previous findings.

TIGIT

TIGIT protein application resulted in a reduction in OC size and number, consistent with findings generated from studies of macrophages and monocytes. TIGIT is necessary for regulation of these mononuclear cells (53) insofar as it downregulates immune activity, reduces activation of mouse peritoneal macrophages, and stimulates polarization towards the anti-inflammatory M2 phenotype via the induction of IL-10 expression (54).

In our study, TIGIT antibody induction showed contrary effects and significantly promoted OC formation. In accordance, Chen et al. demonstrated that TIGIT knockout mice exhibited an M1 macrophage phenotype and were therefore more susceptible to autoimmune diseases (54).

Regarding calcium phosphate lysis, TIGIT protein treatment elevated the activity, contrary to the quantitative examinations. Still, the overall tendency of TIGIT regulation is sustained as, in comparison, TIGIT antibody application resulted in considerably raised lysis of bonelike coating.

Tim-3

Similar to TIGIT, Tim-3 protein induction resulted in impaired osteoclastogenesis, in agreement with published data; Tim-3 has been shown to limit the proportion of M1 macrophages by reducing pro-inflammatory molecules such as TNF α , IFN- γ , and IL-12 (53, 55). Similarly, its ligand galectin-9 is also known as a potent inhibitor of OC differentiation, which it does by reducing the levels of pro-inflammatory mediators such as IL-12, IL-17, and IFN- γ , as has been demonstrated in an *in vitro* culture of murine bone marrow macrophages (41, 56).

The antagonistic Tim-3 antibody used in our study increased the extent of osteoclastogenesis, correlating with a recent study that characterized anti-Tim-3 antibodies as pro-inflammatory due to an increase in IL-12, IL-6, and IL-10 levels being observed after antibody application. Of these, IL-12 acts as a potent inflammatory mediator that would likely increase OC numbers and favor bone destruction (55). Despite these findings, there is some evidence for the contrary effects of Tim-3. Moriyama et al. published that Tim-3 expression correlated with the proportion of TRAP⁺ cells as mononuclear precursors of OCs (56). Moreover, application of an inhibitory Tim-3 antibody reduced PD-1 expression on THP-1 cells, which is a cell line very similar to OCs (55). Considering our results, PD-1 deficiency would result in limited osteoclastogenesis in contrast to the increased OC levels caused by Tim-3 blockade. It was recently reported that PD-1 induction reduced OC numbers (42), which in this case would be analogous to our Tim-3 antibody data that favor osteoclastogenesis. Nevertheless, reduced PD-1 levels would probably affect the stimulation of OC development caused by an antagonistic Tim-3 antibody; however, it can be assumed that the Tim-3-related effect is predominant in terms of OC regulation. Nonetheless, comparing such intricate connections in response to Tim-3 application during osteoclastogenesis is rather difficult in THP-1 cells and therefore, these finding may not be readily transferable between systems.

GITR

OC induction with the GITR protein resulted in an overall increase in OC size and number, which is consistent with current literature. *Via* interaction with its ligand GITRL, GITR stimulates osteoclastogenesis by stimulation of RANKL and downregulation of OPG, resulting in affected bone formation (57). Further, GITR plays a proinflammatory role in autoimmune diseases and chronic inflammatory conditions (58, 59). In this regard, GITR expression is also associated with the proinflammatory M1 macrophage phenotype and stimulation of inflammatory cytokines (57, 59), supporting our findings in OCs. Therefore, it seems reasonable to consider that GITR stimulation would reverse immunosuppression during periods of chronic inflammation, rendering GITR ICIs useful in the treatment of autoimmune disease.

In line with the previously discussed checkpoint modulators, it could be assumed that an antagonistic GITR antibody would reduce osteoclastogenesis. However, in our study the OC size and number remained similar to that of the control group, following GITR antibody treatment. This could possibly be explained by only minimal GITR protein expression in the culture medium that would have been antagonized by such a blocking antibody, resulting in only marginal alterations in OC size and count. Nevertheless, a slightly negative effect on osteoclastogenesis was recognizable for the GITR antibody during our analysis of percentage change in OC number data. A recent publication strengthens the assumption that an antagonistic GITR antibody would reduce OC numbers, as GITR deficiency was shown to decrease the proliferation and phagocytic ability of macrophages (59).

CD47

Similarly to GITR, CD47 protein application resulted in stimulation of osteoclastogenesis. The interaction between CD47 and its ligand SIRP α presents a “don’t eat me” signal, which ultimately prevents phagocytosis by macrophages and OCs (60–63). Similar to the findings of Hobolt-Pedersen et al., who showed CD47⁺ OCs and precursor cells to be rather small compared to the often larger CD47⁻ OCs (60), the size of TRAP⁺ OCs and precursors generated as a result of CD47 application in our study, was the smallest compared to OCs cultured under all other experimental conditions.

We hypothesized that an inhibitory CD47 antibody would impact OC number. However, in this study, the number of OC remained similar to that of the control group (and the antagonistic GITR antibody) on application of anti-CD47. Again, we did not see significant changes in OC size after induction with the inhibitory CD47 antibody, in accordance with previous publications, in which CD47-deficient mice showed reduced OC surface area (61) and increased bone volume (64). Furthermore, significantly fewer OCs were formed from CD47-deficient macrophages (64), likely due to the same mechanisms that are responsible for causing the breakdown of OC fusion, after antagonistic CD47 antibody application (60).

Technical challenges in examination of quantity and quality of OCs

Our experimental approach in this study was slightly different to research previously performed in the complex field of OC biology. Our aim was to perform precise and objective analyses despite the immense level of variation in morphology of OCs and OC precursors. To ensure these qualities, we focused on rather labor-intensive manual examination of the samples instead of error-prone automatic analyses owing to current technical limitations. Thereby, we were able to recognize that changes in OC number were mostly due to alterations in the number of small OCs. Because small OCs are still larger in size than OC precursor cells, the analysis of average TRAP⁺ cell size provided useful insights. We found that the proportion of giant OCs correlated with total OC numbers, resulting in higher numbers of giant OCs under OC-stimulating inductions in contrast to conditions that reduced total osteoclastogenesis. Consequently, these findings suggest that small OCs are responsible for the major changes affecting OC number, whereas giant OC numbers are modified to a lesser extent. This could be due to the process of osteoclastogenesis in which many small OCs undergo fusion into fewer giant OCs, hence, the imbalance in OC sizes and multinuclearity. Moreover, OCs stay longer in their small form and are easier affected by apoptosis once they become multinucleated giant OCs, leading to the conclusion that such an effect is probably not caused by altered formation of OCs.

As a result, we highly recommend the analysis of OCs in complete culture wells and under at least two different levels of magnification. Furthermore, we suggest performing manual quantifications of OC number and size in a reasonably large cohort to counterbalance statistical discrepancies. Counting small and giant OCs separately also provides more insight into immune checkpoint regulated osteoclastogenesis. Despite being somewhat time-consuming, such an approach avoids considerable bias, improves the accuracy of results, and ultimately allows for the comparability and reproducibility of findings.

Despite the variety of checkpoint modulators tested in our study, the validity of results is ensured even though protein-antibody-interaction is necessary for actual effects. Indeed, multiple studies demonstrate that PBMCs express the ligands of the examined checkpoint proteins (49, 58, 65–68). Nonetheless, it is noteworthy that multiple factors regulate expression of checkpoint molecules and ligands which need to be further researched.

In conclusion, these results allow for a better understanding of potential bone-related side effects in patients that receive immune checkpoint inhibition as therapy for malignant disease. It seems plausible that adverse events such as bone fractures represent highly efficient or rather ‘too effective’ therapeutic approaches, considering that some patients who showed a complete clinical response to their cancer therapy after treatment with ICIs suffered bone fractures (3). Hence, the main challenge in cancer therapy is to balance successful anti-malignant therapy while preventing serious, often bone-related, adverse effects. Further research is needed to assess which checkpoint molecules and more specifically, which ICI therapies result in bone

fractures, in addition to examining whether drug dose reduction may be used to manage treatment intensity. Moreover, these findings contribute to improving the insufficient treatment options for conditions such as osteoporosis, septic and aseptic loosening of endoprostheses, bone cancers, as well as side effects of cancer therapy. ICI of checkpoint molecules that upregulate OC levels as well as treatment with agonistic antibodies for stimulation of immune checkpoints responsible for reducing the extent of osteoclastogenesis, may become promising therapy options for the treatment of such conditions of impaired bone homeostasis. However, it should be investigated whether, and if so, how, these specific OC-modulating immune checkpoints affect other cells implicated in bone homeostasis while remembering the other systemic effects of such therapeutic approaches.

Recent studies (69–71) showed correlations of size, number and activity of OCs. Regarding a possible causal connection of these qualities, lysis of bonelike calcium phosphate was carried out and generally substantiates the trends we have seen for OC size and quantity. Such a widely accepted assay for examination of essential pre-resorptive OC activity (70, 72–75) leads to the assumption that these parameters may be related to a certain extent.

Likewise, bone resorption assays display another established method for evaluation of OC function (76, 77). Considering the performed screening approach, these are slightly problematic due to difficult analysis, lack of reproducibility and thus, less comparability of results. In comparison to *in vitro* OC culture, even more severe heterogeneity and variability is seen on bone slices due to bone-specific characteristics and influence on OC biology (78–80). Improving the reliability and affected statistical significance of results requires particularly high numbers of replicates that are – by now – unfeasible for such a large variety of checkpoint conditions. Hence, a direct checkpoint-mediated effect on bone resorption cannot be taken for granted though is rather likely. Despite these complicated aspects, bone resorption assays should definitely be included in further research of selected, particularly promising immune checkpoint and their effects on OC activity.

The lack of consensus between our results and the literature can be explained by fundamental differences between OCs and its precursor cells, human and murine OCs in general, and study conditions in particular. As it is well known that the action of immune checkpoints is highly cell-specific (8, 13, 16, 19), furthermore, due to the lack of OC-specific checkpoint publications, and particularly relating to human OCs, current literature is not sufficient for drawing well-founded conclusion on this topic. For this reason, it would be beneficial to examine the effects of these checkpoint molecules on other cells of relevance in bone regulation.

Our study served to facilitate the methodological approach currently used to conduct osteoclast research, leading to the generation of more objective and reproducible results. Such standardization of experimental research performed on human OCs could enable more accurate comparisons between findings than are currently possible using standard approaches. In addition, we observed significant effects of checkpoint modulation on osteoclast biology, which would be directly applicable to advancing the treatment of osteopenic conditions, such as osteoporosis, the aseptic loosening of endoprostheses, bone cancer, and bone-related side effects of cancer therapy.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the ethics committee of the University of Bonn, Germany. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

Funding

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy – EXC2151 – 390873048 (to FAS). JS and AS were financially supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program, Grant Agreement No. 814495 (EvPro Project).

Acknowledgments

This work is part of the doctoral thesis of VB. We are thankful to Werner Masson for excellent technical support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.988365/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Nonspecific OC controls. OCs of TRAP⁺ cells as counted per culture well after application of unspecific irrelevant protein (BSA) and antibody (rat IgG1, goat IgG, mouse IgG1 and IgG2b) controls in comparison to regular OC control group, resulting in non-significant alterations. Each data point represents the percentage of all OCs of TRAP⁺ cells, analyzed in a square of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation referring to the pooled proportion of total OCs from 2 donors. BSA, bovine serum albumin; Ig, Immunoglobulin.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

OC differentiation methodology. (A) Outline of the OC differentiation protocol. Briefly, after isolation of peripheral blood mononuclear cells, osteoclastogenesis was induced by application of RANKL, MCSF, Vitamin D, and a checkpoint modulator. On day 14, fixation, OC validation and TRAP staining of the cells were performed. PBMC, peripheral blood mononuclear cells; OC, osteoclast; TRAP, Tartrate-resistant acid phosphatase; RANKL, Receptor Activator of NF- κ B ligand; MCSF, Macrophage colony-stimulating factor; Vitamin D, 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃; checkpoint, checkpoint modulator (protein, inhibitory antibody or small molecule inhibitor). (B) Pictures of immunofluorescence staining for validation of OC morphology. The following structures were stained for classification of the cells: nuclei (blue), actin filaments (red), TRAP (green), and calcitonine receptor (yellow). OC precursor cells are defined as TRAP⁺ cells with less than 3 nuclei, whereas TRAP⁺ and CalcR⁺ cells with three or more nuclei are considered Ocs. Representative image, showing half of a tissue culture well with six analysis squares, each measuring 1 mm². Two side-by-side images taken at the same level of magnification to demonstrate the immense inhomogeneities in OC morphology, size, and intensity of TRAP staining.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Assessment of percentual changes of average TRAP⁺ cell size under different treatment conditions. Percentage change in average TRAP⁺ cell size, compared to the control group. (A) Group of PD-1-related checkpoint molecules. (B) Group of checkpoint molecules that are not yet approved for clinical use. Each data point represents the percentual change of the average TRAP⁺ cell size in comparison to the mean control values, analyzed in a square of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001). All data is acquired from at least 3 independent experiments, each with a minimum of 2 donors.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4

Assessment of percentual changes of the total OC number under different treatment conditions. Percentage change in the proportion of total OCs, compared to the control group. (A) Group of PD-1-related checkpoint molecules. (B) Group of checkpoint molecules that are not yet approved for clinical use. Each data point represents the percentual change of the total OC number in comparison to the mean control values, analyzed in a square of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001). All data is acquired from at least 3 independent experiments, each with a minimum of 2 donors.

SUPPLEMENTARY FIGURE 5

Imaging of OC differentiation under different treatment conditions. Representative images (captured at 10x magnification) of OC differentiation on day 14, following treatment with different checkpoint modulators. Nivo, nivolumab; 10, 10 μ g/mL; 100, 100 μ g/mL.

SUPPLEMENTARY FIGURE 6

Analysis of average size of TRAP⁺ cells and percentual changes. (A) Average size of TRAP⁺ cells calculated in six squares (each measuring 1 mm²) per culture well. (B) Percentual change of average TRAP⁺ cell size compared to the control group. Each data point represents (A) the average size of TRAP⁺ cells and (B) the percentual change of the cell size, analyzed in squares of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001). All data is acquired from at least 2 independent experiments, each with a minimum of 3 donors.

SUPPLEMENTARY FIGURE 7

Assessment of the percentage of OC numbers of TRAP⁺ cells and percentual changes. (A) OCs of TRAP⁺ cells as counted in the previously utilized six squares (each measuring 1 mm²) per culture well. Columns are divided by the percentage of small OCs (TRAP⁺, 3 – 10 nuclei) and giant OCs (TRAP⁺, >10 nuclei) and labelled with the percentual values, respectively. Significance and standard deviation bars refer to proportion of total OCs. (B) Percentual change in the total OC population, compared to the control group. (C) Small OCs and (D) giant OCs were counted separately in each square. Significance and standard deviation bars refer to proportions of small and giant OCs, respectively. Each data point represents (A) the percentage of the total OC number of TRAP⁺ cells, (B) its percentual change compared to the Control, and the percentage of (C) small and (D) giant OCs, analyzed in squares of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001). All data is acquired from at least 2 independent experiments, each with a minimum of 3 donors.

SUPPLEMENTARY FIGURE 8

Lysis of bonelike apatitic calcium phosphate coating. For evaluation of OC functional activity, lysis of a calcium phosphate coating was evaluated after application of checkpoint regulators during osteoclastogenesis. (A) Comparison of exemplary pictures of von Kossa-stained bonelike coating (captured at 10x magnification) without any treatment ($\emptyset$) and after application of OC differentiation medium for 9 days (CO). Remaining coating is stained black whereas white areas represent lysed calcium phosphate coating. Percentages of resorbed coating of (B) PD-1 related checkpoints and (C) immune checkpoint molecules of the group of checkpoint modulators that are not yet clinically used were analyzed in 7 squares per culture well, each measuring 1mm². Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001). Data from one of 2 representative donors is presented.

SUPPLEMENTARY FIGURE 9

Percentage of giant OCs (within the total number of OCs). Giant OCs make up a significant proportion of total OCs. As all treatment conditions were well below 50%, alterations in total OC number are mostly due to changes in the number of small OCs. Each data point represents the percentage of giant OCs of the total OC number, analyzed in a square of 1 mm², of which 6 were assessed per culture well. Columns show mean and standard deviation. Asterisks indicate level of significance in comparison to CO, set at $P < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001). All data is acquired from at least 2 independent experiments, each with a minimum of 3 donors.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

Checkpoint modulators, final concentrations, and suppliers used to investigate their effects on OC differentiation.

References

- Moseley KF, Naidoo J, Bingham CO, Carducci MA, Forde PM, Gibney GT, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint inhibitors affecting the skeleton: a seminal case series. *J Immunother Cancer* (2018) 6(1):104. doi: 10.1186/s40425-018-0417-8
- Cai XP, Zhao Q, Guo ZD, Lin SJ, Chen ZX, Chen MY, et al. Potential diagnostic value of PD-1 in peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal osteoporosis patients. *J Clin Lab Anal* (2020) 34(6):e23223. doi: 10.1002/jcla.23223
- Filippini DM, Gatti M, Di Martino V, Cavalieri S, Fusaroli M, Ardizzoni A, et al. Bone fracture as a novel immune-related adverse event with immune checkpoint inhibitors: Case series and large-scale pharmacovigilance analysis. *Int J Cancer* (2021) 149(3):675–83. doi: 10.1002/ijc.33592
- De Martinis M, Sirufo MM, Ginaldi L. Osteoporosis: Current and emerging therapies targeted to immunological checkpoints. *Curr Med Chem* (2020) 27(37):6356–72. doi: 10.2174/0929867326666190730113123
- Terashima A, Takayanagi H. Overview of osteoimmunology. *Calcif Tissue Int* (2018) 102(5):503–11. doi: 10.1007/s00223-018-0417-1
- Walsh MC, Takegahara N, Kim H, Choi Y. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity. *Nat Rev Rheumatol* (2018) 14(3):146–56. doi: 10.1038/nrrheum.2017.213
- Jubel JM, Randau TM, Becker-Gotot J, Scheidt S, Wimmer MD, Kohlhof H, et al. sCD28, sCD80, sCTLA-4, and sBTLA are promising markers in diagnostic and

- therapeutic approaches for aseptic loosening and periprosthetic joint infection. *Front Immunol* (2021) 12:687065. doi: 10.3389/fimmu.2021.687065
8. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* (2015) 348 (6230):56–61. doi: 10.1126/science.aaa8172
9. Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* (2018) 18(2):91–104. doi: 10.1038/nri.2017.112
10. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdynseva N, Pavlov V, et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers. *Front Oncol* (2020) 10:566511. doi: 10.3389/fonc.2020.566511
11. Hoves S, Ooi CH, Wolter C, Sade H, Bissinger S, Schmittnaegel M, et al. Rapid activation of tumor-associated macrophages boosts preexisting tumor immunity. *J Exp Med* (2018) 215(3):859–76. doi: 10.1084/jem.20171440
12. Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer. *Trends Immunol* (2019) 40(4):310–27. doi: 10.1016/j.it.2019.02.003
13. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity* (2016) 44(5):955–72. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.002
14. Sacdalan DB, Lucero JA. The association between inflammation and immunosuppression: Implications for ICI biomarker development. *Onco Targets Ther* (2021) 14:2053–64. doi: 10.2147/OTT.S278089
15. Vivarelli S, Falzone L, Torino F, Scandurra G, Russo G, Bordonaro R, et al. Immune-checkpoint inhibitors from cancer to COVID-19: A promising avenue for the treatment of patients with COVID-19 (Review). *Int J Oncol* (2021) 58(2):145–57. doi: 10.3892/ijo.2020.5159
16. Lei Y, Li X, Huang Q, Zheng X, Liu M. Progress and challenges of predictive biomarkers for immune checkpoint blockade. *Front Oncol* (2021) 11:617335. doi: 10.3389/fonc.2021.617335
17. Johnson DB, Nebhan CA, Moslehi JJ, Balko JM. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity. *Nat Rev Clin Oncol* (2022) 19(4):254–67. doi: 10.1038/s41571-022-00600-w
18. Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun* (2020) 11(1):3801. doi: 10.1038/s41467-020-17670-y
19. Brom VC, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The role of immune checkpoint molecules on macrophages in cancer, infection, and autoimmune pathologies. *Front Immunol* (2022) 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.837645
20. Corsello SM, Barnabei A, Marchetti P, De Vecchis L, Salvatori R, Torino F. Endocrine side effects induced by immune checkpoint inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98(4):1361–75. doi: 10.1210/jc.2012-4075
21. Palmieri DJ, Carlino MS. Immune checkpoint inhibitor toxicity. *Curr Oncol Rep* (2018) 20(9):72. doi: 10.1007/s11912-018-0718-6
22. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* (2015) 372(21):2006–17. doi: 10.1056/NEJMoa1414428
23. Khan S, Gerber DE. Autoimmunity, checkpoint inhibitor therapy and immune-related adverse events: A review. *Semin Cancer Biol* (2020) 64:93–101. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.06.012
24. Saha D, Martuza RL, Rabkin SD. Macrophage polarization contributes to glioblastoma eradication by combination immunovirotherapy and immune checkpoint blockade. *Cancer Cell* (2017) 32(2):253–67.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2017.07.006
25. Khair DO, Bax HJ, Mele S, Crescioli S, Pellizzari G, Khiabany A, et al. Combining immune checkpoint inhibitors: Established and emerging targets and strategies to improve outcomes in melanoma. *Front Immunol* (2019) 10:453. doi: 10.3389/fimmu.2019.00453
26. Varayathu H, Sarathy V, Thomas BE, Mufti SS, Naik R. Combination strategies to augment immune check point inhibitors efficacy - implications for translational research. *Front Oncol* (2021) 11:559161. doi: 10.3389/fonc.2021.559161
27. Gibellini L, De Biasi S, Porta C, Lo Tartaro D, Depenni R, Pellacani G, et al. Single-cell approaches to profile the response to immune checkpoint inhibitors. *Front Immunol* (2020) 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00490
28. Borggrewe M, Kooistra SM, Noelle RJ, Eggen BJL, Laman JD. Exploring the VISTA of microglia: immune checkpoints in CNS inflammation. *J Mol Med (Berl)* (2020) 98 (10):1415–30. doi: 10.1007/s00109-020-01968-x
29. Cassetta L, Kitamura T. Macrophage targeting: opening new possibilities for cancer immunotherapy. *Immunology* (2018) 155(3):285–93. doi: 10.1111/imm.12976
30. Hou A, Hou K, Huang Q, Lei Y, Chen W. Targeting myeloid-derived suppressor cell, a promising strategy to overcome resistance to immune checkpoint inhibitors. *Front Immunol* (2020) 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00783
31. Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, et al. Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol Res* (2015) 3 (4):399–411. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0215
32. Duan Z, Luo Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* (2021) 6(1):127. doi: 10.1038/s41392-021-00506-6
33. Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med* (2015) 212(4):435–45. doi: 10.1084/jem.20150295
34. Tas AC, Bhaduri SB. Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10x simulated body fluid. *J Mater Res* (2004) 19 (9):2742–9. doi: 10.1557/JMR.2004.0349
35. Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, et al. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* (2015) 16(1):75–84. doi: 10.1038/ni.3035
36. Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, et al. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol* (2011) 12(11):1096–104. doi: 10.1038/ni.2112
37. Lampiasi N, Russo R, Zito F. The alternative faces of macrophage generate osteoclasts. *BioMed Res Int* (2016) 2016:9089610. doi: 10.1155/2016/9089610
38. Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras J. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J Cell Sci* (2018) 131(11):1–11. doi: 10.1242/jcs.216267
39. Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, et al. Macrophage-osteoclast associations: Origin, polarization, and subgroups. *Front Immunol* (2021) 12:778078. doi: 10.3389/fimmu.2021.778078
40. Yao Y, Cai X, Ren F, Ye Y, Wang F, Zheng C, et al. The macrophage-osteoclast axis in osteoimmunity and osteo-related diseases. *Front Immunol* (2021) 12:664871. doi: 10.3389/fimmu.2021.664871
41. Tai YT, Cho SF, Anderson KC. Osteoclast immunosuppressive effects in multiple myeloma: Role of programmed cell death ligand 1. *Front Immunol* (2018) 9:1822. doi: 10.3389/fimmu.2018.01822
42. Greisen SR, Kragstrup TW, Thomsen JS, Horslev-Pedersen K, Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, et al. The programmed death-1 pathway counter-regulates inflammation-induced osteoclast activity in clinical and experimental settings. *Front Immunol* (2022) 13:773946. doi: 10.3389/fimmu.2022.773946
43. Wang K, Gu Y, Liao Y, Bang S, Donnelly CR, Chen O, et al. PD-1 blockade inhibits osteoclast formation and murine bone cancer pain. *J Clin Invest* (2020) 130(7):3603–20. doi: 10.1172/JCI133334
44. Nagahama K, Aoki K, Nonaka K, Saito H, Takahashi M, Varghese BJ, et al. The deficiency of immunoregulatory receptor PD-1 causes mild osteopetrosis. *Bone* (2004) 35 (5):1059–68. doi: 10.1016/j.bone.2004.06.018
45. Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat Immunol* (2020) 21(4):442–54. doi: 10.1038/s41590-020-0620-x
46. Cai J, Qi Q, Qian X, Han J, Zhu X, Zhang Q, et al. The role of PD-1/PD-L1 axis and macrophage in the progression and treatment of cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2019) 145(6):1377–85. doi: 10.1007/s00432-019-02879-2
47. Xiong H, Mittman S, Rodriguez R, Moskalenko M, Pacheco-Sanchez P, Yang Y, et al. Anti-PD-L1 treatment results in functional remodeling of the macrophage compartment. *Cancer Res* (2019) 79(7):1493–506. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3208
48. Greisen SR, Kragstrup TW, Thomsen JS, Hansen AS, Krishnamurthy A, Horslev-Petersen K, et al. Programmed death ligand 2 - a link between inflammation and bone loss in rheumatoid arthritis. *J Transl Autoimmun* (2020) 3:100028. doi: 10.1016/j.jtauto.2019.100028
49. Philips EA, García-España A, Tocheva AS, Ahearn IM, Adam KR, Pan R, et al. The structural features that distinguish PD-L2 from PD-L1 emerged in placental mammals. *J Biol Chem* (2020) 295(14):4372–80. doi: 10.1074/jbc.AC119.011747
50. Zak KM, Grudnik P, Magiera K, Dömling A, Dubin G, Holak TA. Structural biology of the immune checkpoint receptor PD-1 and its ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* (2017) 25(8):1163–74. doi: 10.1016/j.str.2017.06.011
51. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* (2017) 47(5):765–79. doi: 10.1002/eji.201646875
52. Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Truneh A, Nunes JA, et al. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol* (2010) 22(8):651–60. doi: 10.1093/intimm/dxq049
53. Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev* (2017) 276(1):97–111. doi: 10.1111/imr.12520
54. Chen X, Lu PH, Liu L, Fang ZM, Duan W, Liu ZL, et al. TIGIT negatively regulates inflammation by altering macrophage phenotype. *Immunobiology* (2016) 221(1):48–55. doi: 10.1016/j.imbio.2015.08.003
55. Ocaña-Guzman R, Torre-Bouscoulet L, Sada-Ovalle I. TIM-3 regulates distinct functions in macrophages. *Front Immunol* (2016) 7:229. doi: 10.3389/fimmu.2016.00229
56. Moriyama K, Kukita A, Li YJ, Uehara N, Zhang JQ, Takahashi I, et al. Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: possible involvement of the Tim-3/galactin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. *Lab Invest* (2014) 94(11):1200–11. doi: 10.1038/labinvest.2014.107
57. Shin HH, Kim SJ, Kang SY, Lee DS, Choi HS. Soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor stimulates osteoclastogenesis by down-regulation of osteoprotegerin in bone marrow stromal cells. *Bone* (2006) 39(4):716–23. doi: 10.1016/j.bone.2006.03.015
58. Tian J, Zhang B, Rui K, Wang S. The role of GITR/GITRL interaction in autoimmune diseases. *Front Immunol* (2020) 11:588682. doi: 10.3389/fimmu.2020.588682
59. Fu Z, Wang S, Li J, Zhang Y, Li H, Li G, et al. Biological role of GITR/GITRL in attributes and immune responses of macrophage. *J Leukoc Biol* (2020) 107(2):309–21. doi: 10.1002/JLB.3A0919-387RR
60. Hobolt-Pedersen AS, Delaissé JM, Søe K. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int* (2014) 95(1):73–82. doi: 10.1007/s00223-014-9864-5

61. Lundberg P, Koskinen C, Baldock PA, Löthgren H, Stenberg A, Lerner UH, et al. Osteoclast formation is strongly reduced both *in vivo* and *in vitro* in the absence of CD47/SIRP α -interaction. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 352(2):444–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.057
62. Liu J, Xavy S, Mihardja S, Chen S, Sompalli K, Feng D, et al. Targeting macrophage checkpoint inhibitor SIRP α for anticancer therapy. *JCI Insight* (2020) 5(12):1–2. doi: 10.1172/jci.insight.134728
63. Chao MP, Takimoto CH, Feng DD, McKenna K, Gip P, Liu J, et al. Therapeutic targeting of the macrophage immune checkpoint CD47 in myeloid malignancies. *Front Oncol* (2019) 9:1380. doi: 10.3389/fonc.2019.01380
64. Uluçkan O, Becker SN, Deng H, Zou W, Prior JL, Piwnica-Worms D, et al. CD47 regulates bone mass and tumor metastasis to bone. *Cancer Res* (2009) 69(7):3196–204. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3358
65. Chauvin JM, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* (2020) 8(2):1–2. doi: 10.1136/jitc-2020-000957
66. Harjunpää H, Guillerrey C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol* (2020) 200(2):108–19. doi: 10.1111/cei.13407
67. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, et al. Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ treg development by galectin-9 secretion. *PLoS One* (2012) 7(11):e48574. doi: 10.1371/journal.pone.0048574
68. Takahashi S. Molecular functions of SIRP α and its role in cancer. *BioMed Rep* (2018) 9(1):3–7. doi: 10.3892/br.2018.1102
69. Hiram-Bab S, Liron T, Deshet-Unger N, Mittelman M, Gassmann M, Rauner M, et al. Erythropoietin directly stimulates osteoclast precursors and induces bone loss. *FASEB J* (2015) 29(5):1890–900. doi: 10.1096/fj.14-259085
70. Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Nagai A, Yamashita K. Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption. *J BioMed Mater Res A*. (2013) 101(11):3141–51. doi: 10.1002/jbm.a.34621
71. Abdallah D, Jourdain M-L, Braux J, Guillaume C, Gangloff SC, Jacquot J, et al. An optimized method to generate human active osteoclasts from peripheral blood monocytes. *Front Immunol* (2018) 9(632). doi: 10.3389/fimmu.2018.00632
72. Ciapetti G, Di Pompo G, Avnet S, Martini D, Diez-Escudero A, Montufar EB, et al. Osteoclast differentiation from human blood precursors on biomimetic calcium-phosphate substrates. *Acta Biomater* (2017) 50:102–13. doi: 10.1016/j.actbio.2016.12.013
73. Wang X, Yu Y, Ji L, Geng Z, Wang J, Liu C. Calcium phosphate-based materials regulate osteoclast-mediated osseointegration. *Bioact Mater* (2021) 6(12):4517–30. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.003
74. Zhang Y, Shu T, Wang S, Liu Z, Cheng Y, Li A, et al. The osteoinductivity of calcium phosphate-based biomaterials: A tight interaction with bone healing. *Front Bioeng Biotechnol* (2022) 10:911180. doi: 10.3389/fbioe.2022.911180
75. Jansen IDC, van Velzen T, de Vries TJ, Szulcek R, van Loon J. Real-time quantification of osteoclastic resorptive activity by electric cell-substrate impedance sensing. *Front Cell Dev Biol* (2022) 10:921066. doi: 10.3389/fcell.2022.921066
76. Badran Z, Pilet P, Verron E, Boulter JM, Weiss P, Grimandi G, et al. Assay of *in vitro* osteoclast activity on dentine, and synthetic calcium phosphate bone substitutes. *J Mater Sci Mater Med* (2012) 23(3):797–803. doi: 10.1007/s10856-011-4534-x
77. Panagopoulos V, Liapis V, Zinonos I, Hay S, Leach DA, Ingman W, et al. Peroxidase enzymes inhibit osteoclast differentiation and bone resorption. *Mol Cell Endocrinol* (2017) 440:8–15. doi: 10.1016/j.mce.2016.11.007
78. Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* (2011) 1240:E13–8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06373.x
79. Hadjidakis DJ, Androulakis IL. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* (2006) 1092:385–96. doi: 10.1196/annals.1365.035
80. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res* (2018) 59(2):99–107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085

2.2 Veröffentlichung 2



The Role of Immune Checkpoint Molecules on Macrophages in Cancer, Infection, and Autoimmune Pathologies

Victoria C. Brom, Christof Burger, Dieter C. Wirtz and Frank A. Schildberg*

Clinic for Orthopedics and Trauma Surgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Anatolij Horuzsko,
Augusta University, United States

Reviewed by:

Ashwin Ajith,
Augusta University, United States
Bernard Vanhove,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

*Correspondence:

Frank A. Schildberg
frank.schildberg@ukbonn.de

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance
and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 16 December 2021

Accepted: 02 March 2022

Published: 28 March 2022

Citation:

Brom VC, Burger C, Wirtz DC and
Schildberg FA (2022) The Role of
Immune Checkpoint Molecules on
Macrophages in Cancer, Infection,
and Autoimmune Pathologies.
Front. Immunol. 13:837645.
doi: 10.3389/fimmu.2022.837645

Immune checkpoint inhibitors have revolutionized immunotherapy against various cancers over the last decade. The use of checkpoint inhibitors results in remarkable re-activation of patients' immune system, but is also associated with significant adverse events. In this review, we emphasize the importance of cell-type specificity in the context of immune checkpoint-based interventions and particularly focus on the relevance of macrophages. Immune checkpoint blockade alters the dynamic macrophage phenotypes and thereby substantially manipulates therapeutical outcome. Considering the macrophage-specific immune checkpoint biology, it seems feasible to ameliorate the situation of patients with severe side effects and even increase the probability of survival for non-responders to checkpoint inhibition. Apart from malignancies, investigating immune checkpoint molecules on macrophages has stimulated their fundamental characterization and use in other diseases as well, such as acute and chronic infections and autoimmune pathologies. Although the macrophage-specific effect of checkpoint molecules has been less studied so far, the current literature shows that a macrophage-centered blockade of immune checkpoints as well as a stimulation of their expression represents promising therapeutic avenues. Ultimately, the therapeutic potential of a macrophage-focused checkpoint therapy might be maximized by diagnostically assessing individual checkpoint expression levels on macrophages, thereby personalizing an effective treatment approach for each patient having cancer, infection, or autoimmune diseases.

Keywords: macrophage, myeloid cell, checkpoint inhibitor, cancer, infection, autoimmune disease, immunotherapy, immunodiagnostics

INTRODUCTION

The importance of the field of immunotherapy is well recognized in treating various diseases. Recently, the success of immune checkpoint inhibition has revolutionized therapeutic options, especially in oncology. Blockade of the so-called checkpoint molecules is crucial in regulating immune reactions, as these co-receptors modulate immune responses following antigen presentation. Ideally, this form of therapy provides effective immune reaction on the one hand

and allows maintenance of sufficient self-tolerance while preventing autoimmunity and avoiding excessive immune cell activation on the other.

In general, immune reaction to pathogens results from major histocompatibility complex (MHC)-bound antigen presentation specifically activating T cells, which then regulate the quality and duration of immune responses. At the same time, secondary molecules make a further impact on the interaction between antigen-presenting cells (APCs) and T cells; for example, immune checkpoint molecules on the surface of T cells balance this pathway as co-stimulatory or co-inhibitory receptors (1, 2).

Innovative checkpoint inhibitors do not aim to directly kill pathogenic cells as is the purpose of chemo- or radiotherapy, instead focus on regaining immune competence to restore endogenous anti-tumor activity (3, 4). These monoclonal antibodies function by suppression of immune checkpoints that act as co-regulatory receptors and limit immune responses, which in turn leads to thorough activation of the immune system (5, 6). Complex dynamic immune responses following checkpoint inhibition are particularly accomplished by downregulating the activation of naïve T cells, resulting in enhanced immunity and maintenance of self-tolerance (3). Therefore, this therapeutic modulation can be visualized as a gas and brake pedal for immune system regulation, because the possible outcomes are enhanced or restrained immune responses as a consequence of either promoting or restricting stimulatory and inhibitory pathways.

So far, checkpoint inhibition is used in cancer therapy to control T cell function and has proven to be effective against a broad spectrum of cancer types (7). Immunotherapy offers a highly promising anti-cancer strategy that has already achieved remarkable clinical benefit in, e.g., malignant melanoma, non-small cell lung cancer, renal and bladder cancers (8); hence, the use of immune checkpoint inhibitors across the spectrum of human cancers is rapidly expanding. Despite the reasonable success of checkpoint therapy, many patients are non-responders to checkpoint therapy, and only a minority achieve sufficient anti-cancer response (9, 10). Currently, the unlikelihood of immunologically cold tumors responding to immune checkpoint blockade is attributed to upregulation of alternative immune checkpoint pathways on T cells (11).

For this reason, there is an urgent need to improve checkpoint immunotherapy. The limitations could already be partly overcome by combination of different checkpoints for immune checkpoint blockade, e.g., CTLA-4 and PD-L1 to restore T cell effector function (12). Still, only few patients respond and experience sufficient anti-tumor immunity despite increased cytotoxicity in combination therapy. Moreover, this leads to more severe side effects, such as inflammatory reactions in the brain, gastrointestinal organs and cardiovascular system (13–15). Consequently, the current knowledge has to be further expanded. At present, certain checkpoints are widely inhibited on all their expressing cells. In contrast to this broad approach, it seems highly advantageous to perform immune checkpoint inhibition (ICI) cell-type specifically. When focused on one immune cell that is relevant for disease progression and simultaneously

expressing the targeted checkpoint molecule, such an individualized treatment may promote remarkable immunity. At the same time, it might reduce adverse events originated from manipulation of the entire immune system. Even stimulation of checkpoint proteins on specific immune cells may be a promising therapeutic option in the future, as for some diseases it is not overexpression but rather a lack of checkpoint regulation causing illness.

In this review, macrophages will be discussed as another cell population contributing to immune reaction, given their expression of co-stimulatory and co-inhibitory checkpoint molecules. Unfortunately, even today, it is difficult to accumulate data regarding immune checkpoint targeting on mononuclear phagocytic cells, because evidence mostly comes from coincidental findings. However, as some pieces of information can be combined, new exciting application areas emerge and create further possibilities for beneficial therapy *via* checkpoint modulation.

Therefore, we discuss in detail how cancer immunotherapy can be improved by considering checkpoint inhibition on macrophages. This may potentially allow to enable advanced personalized treatment and use levels of checkpoint expression as predictive biomarkers. Treatment outcomes are already being anticipated by examination of checkpoint expression on T cells, potentially being transferable to macrophages as well. Beyond that, we speculate whether focusing checkpoint regulation through ICI or the use of novel agonistic antibodies on cell types other than T lymphocytes may hold potential to treat pathologies aside from malignancy, e.g., infectious diseases in acute or chronic phases.

CO-INHIBITORY AND CO-STIMULATORY MOLECULES ON MACROPHAGES IN CANCER

With the focus on malignancies, the organization of an immunosuppressive microenvironment to undercut the immune system is considered a hallmark of cancer (4). Besides T cells, cells of the myelomonocytic lineage are also known to be contributing factors to this immunosuppressive environment and are therefore essential targets for cancer cells that evade immune clearance.

The expression of a variety of co-regulatory receptors on macrophages, such as PD-L1, PD-L2, CTLA-4 ligands B7-1 and B7-2, Tim-3, CD47, V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA), and B7-H4 (16–18), has been shown to correlate with exhausted T cell phenotypes and therefore with an immunosuppressive tumor environment and poor clinical outcome (18–20). Given that checkpoint receptors are broadly upregulated in tumor-associated macrophages (TAM) (21), which contribute to the main aspects of malignancy such as immune suppression, metastasis, invasiveness, angiogenesis, and therapeutic resistance (5, 22, 23), it seems quite likely that these findings depict causality of checkpoint expression on macrophages and macrophage-derived tumor promotion. As a

consequence, it is to be assumed that macrophages can be regulated by checkpoint inhibition. This serves the intention of reversing TAM-provided tumor promotion and enhances macrophages' anti-tumor immune potential (17). Thus far, there is evidence that checkpoint inhibitors cause a change in macrophage polarity from M2- to M1-phenotype (**Figure 1**). This results in sufficient immunity against cancer cells (17, 19, 23), as M1 macrophages are pro-inflammatory in contrast to the mostly anti-inflammatory, hence pro-tumor M2 macrophage phenotype (18, 22, 24).

TAM originate from newly recruited monocytes as well as resident tissue-specific macrophages through microenvironmental stimuli such as chemokines, cytokines, extracellular matrix components and hypoxia (17, 25). Due to their origin from independent specific lineages and therefore, great plasticity, TAM are highly heterogenous and subsequently exceedingly difficult to differentiate (26). Characterization of TAM is further complicated as a result of constant adaptation to environmental stimuli, lack of specific markers in between populations and differences between human and animal experiments as well as between *in vitro* and *in vivo* studies (27–29).

In general, however, M1 TAMs are defined by expression of CD68, CD80 and CD86 and secretion of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, and IL-23 as well as nitric oxide (NO) synthase that contribute to eliminating tumor cells (30–32). On the contrary, M2 TAMs express CD163 and CD206 (27, 33) and secrete IL-10, TGF- β , CCL2, CCL5 (30, 31) and IL-13 that maintain the immune-suppressive environment (5). It is further shown that in contrast to M1 macrophages, TAM usually express high levels of checkpoint proteins in most cancer diseases (34). Though, depending on the specific disease, macrophage subtypes vary significantly and co-expression of additional

molecules is often noticed (22). The shift in macrophage polarity towards the inflammatory M1 type can be induced by cytokines associated with inflammation and removal of tumor cells and pathogens, e.g., IFN- γ , LPS, TNF α , and GM-CSF (17). Moreover, checkpoint molecules can stimulate polarization towards the inflammatory M1 type by secreting proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-12, TNF α , MIP1a, and NO as Hoves et al. showed macrophages being modulated towards the pro-tumor phenotype due to application of CD40 (35). In many cases, it is confirmed that transformation of macrophages from M2- to M1-phenotype is sufficient to cause an anti-tumor immune response (22, 36, 37).

Based on the following examples of aggressive cancer pathologies with overall high mortality and need for improvement of the currently insufficient treatment options, we have attempted to explain the influences of co-regulatory receptors on macrophage function, with particular focus on their phagocytic ability. Thereby, certain recurring patterns become apparent, allowing predictions about the way other checkpoint molecules could affect anti-tumor immunity and how this may be used to improve cancer therapy in the future.

Colorectal Cancer

Colorectal cancer is an important disease in this regard, as patients rarely show clinical symptoms in early stages when standard treatment options could provide satisfactory effects. Survival rates drastically decrease in advanced stages of cancer as metastasized cancer is often incurable (26, 38, 39).

There is evidence for expression of checkpoint molecules on TAMs (**Figure 1**). Gordon et al. provided new insights into PD-1 expression by restricting innate and adaptive immune reactions in human colorectal cancer and mouse colon cancer (**Table 1**). In both mouse and human TAMs, high expression levels of PD-1

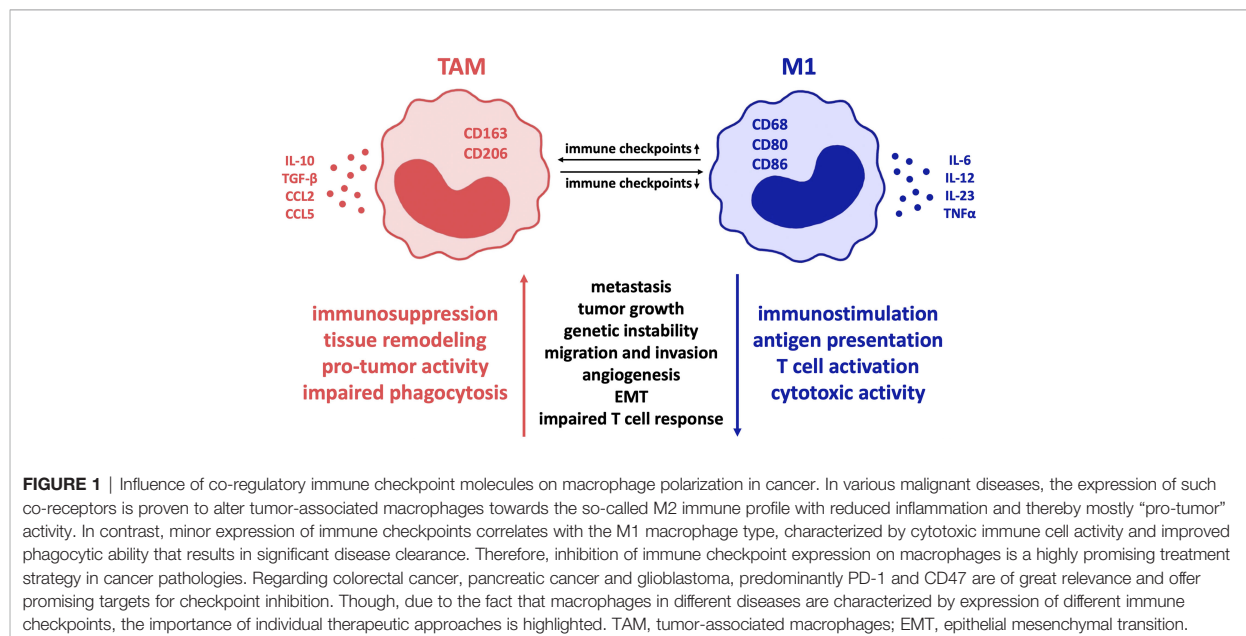


TABLE 1 | Summary of the effects that up- and downregulation of immune checkpoint expression have on macrophage polarity and resulting consequences in malignant, infectious, and autoimmune diseases following up- or downregulation of immune checkpoint expression.

	CHECKPOINT MOLECULE	EXPRESSION ↑ / STIMULATION	EXPRESSION ↓ / INHIBITION	POSSIBLE THERAPY	REFERENCES
CANCER					
colorectal cancer	PD-1	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(25)
	CD47	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(26–28)
pancreatic cancer	PD-1	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(17, 29–32, 34)
	VISTA	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(29, 31–33)
glioblastoma	CD47	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(34)
	CD47	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(12, 13, 38–40)
	PD-1	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(37, 41–43)
	CD73	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(41, 44–47)
	CTLA-4	disease progression (M2)	TAM phagocytosis (M1)	ICI	(41–43)
INFECTION					
chronic viral					
HBV/HCV	PD-1	viral persistence (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(2, 48–51)
	Tim-3	viral persistence (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(2, 48, 50–54)
HIV	PD-1	viral persistence (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(55–58)
	Tim-3	inflammatory immune reaction (M1)	HIV production (M2)	stimulation	(59)
	VISTA	viral persistence (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(60)
acute viral					
Influenza A	Tim-3	viral persistence (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(61–63)
bacterial					
tuberculosis	PD-1	dual role	dual role		(64–68)
	Tim-3	disease progression (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(69)
sepsis	PD-1	disease progression (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(67, 70–76)
AUTOIMMUNITY					
MS/EAE	VISTA	phagocytosis, improved survival	disease progression	stimulation	(60, 77–83)
	PD-1	improved survival	disease progression	stimulation	(49, 84, 85)
	CD47	reduced phagocytosis, disease progression	phagocytosis, inflammatory immune reaction	ICI	(86)
atherosclerosis	CD47	disease progression (M2)	inflammatory immune reaction (M1)	ICI	(87–89)
	PD-1	tbd	disease progression (M2)	stimulation	(90–93)
	Tim-3,-4	tbd	disease progression	stimulation	(93–95)
	GITR	disease progression (phagocytosis)	improved survival	ICI	(96–100)
diabetes type 1	CD47	improved survival (limited phagocytosis, M2)	disease progression (phagocytosis)	stimulation	(101–104)
	PD-1	improved survival (limited phagocytosis, M2)	disease progression	stimulation	(105)

As checkpoint expression has specific consequences in a disease, individual treatment options can be deduced. Depending on the characteristics of the pathology and each patient's expression pattern, either promotion of a particular immune checkpoint expression or restriction via immune checkpoint inhibition (ICI) displays potential therapeutical options. In addition, even combined stimulation or inhibition of certain expression rates can be applied to improve disease severity and therefore ameliorate patients' wellbeing. ICI, Immune checkpoint inhibition; HBV, Hepatitis B virus; HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus; MS, Multiple sclerosis; EAE, Experimental autoimmune encephalomyelitis; tbd, to be defined.

were detected that correlated with reduced phagocytosis and therefore with disease severity (40). Such findings in murine models can be explained by contrary TAM polarization states: The majority of PD-1⁺ TAMs show the pro-tumor M2-macrophage profile, whereas PD-1-deficient TAMs express the inflammatory, anti-tumor M1-immunoprofile (40). However, PD-1 deficiency leads to significantly lower tumor burden because of increased phagocytic ability, which implies that regular TAM function can be re-established. PD-1 was previously known to restrain various immune cells in the tumor microenvironment (including T cells, B cells, NK cells, and DCs), but it can now also be applied to macrophages based on recent information.

Besides PD-1, the CD47-SIRPα-axis seems to be a promising target in colorectal cancer. In addition to enhancing T cell activation to improve anti-cancer immunity (41), the checkpoint

molecule CD47 acts as an efficient “don't eat me” signal. Moreover, its binding to SIRPα on macrophages and dendritic cells (DC) results in drastically reduced phagocytosis, allowing tumor progression (M2) (44). Tumor cells take advantage of this potent mechanism to evade immune clearance and thereby avoid being destroyed by phagocytic cells. Similar to what is seen in modulating PD-1 in colorectal cancer, inhibiting the CD47 checkpoint pathway has been shown to restore function of macrophages and thus led to growth inhibition and regression of tumor cells in experimental models (44, 45). Presumably, improved phagocytosis following CD47 inhibition is due to a change in macrophage polarization towards the inflammatory M1 phenotype.

Overall, immune checkpoint inhibition represents an innovative therapeutic approach for colorectal cancer, as antibodies inhibiting PD-1 and CD47 will restore patients'

immune competence and regain the ability to eliminate cancer cells. Combination of different immune checkpoint inhibitors may be an option to treat more severe cases of colorectal cancer, though will most likely be accompanied by extensive adverse effects.

Pancreatic Cancer

Patients with pancreatic cancer develop no or merely unspecific symptoms until the disease has considerably advanced, and simultaneously show early metastatic spread. Current surgical and radiation therapies are only feasible in non-metastatic forms of pancreatic cancer. Because of these limited therapeutic options, the survival rates can be as low as 5% (21, 42, 43, 46, 47, 106, 107).

About 12.5% of pancreatic cancer patients express PD-L1, which, when binding to PD-1, leads to T cell anergy and apoptosis, resulting in cancer cells being able to evade the immune system (106, 108). Until today, solely targeting the PD-1-PD-L1 axis has however not been successful in pancreatic cancer (21, 46). Despite that, significant reduction of tumor progression can be achieved by combined administration of inhibitory antibodies targeting PD-1 and BAG-3 (109).

The expression of VISTA as another checkpoint molecule has been reported on CD68⁺ macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) at an even higher rate than the structurally similar PD-1 (46, 48). VISTA⁺ cells showed an anti-inflammatory M2 macrophage phenotype and therefore present a pro-tumor profile. VISTA on macrophages is likely to be a promising target for immune checkpoint inhibition, because it is expressed most often in human PDAC (48) and reversing the M2 phenotype to an M1-like profile through VISTA ICI will result in an inflammatory anti-tumor reaction.

The different expression patterns on macrophages may in part explain why anti-PD-1 antibodies alone do not result in sufficient anti-cancer immunity. VISTA and PD-1 as checkpoints represent separate inhibitory pathways. Despite anti-PD-1 therapy enhancing T cell function, this alone is considered not powerful enough in a pro-tumor microenvironment and would require the immune status to be changed beforehand. Supporting the hypothesis of rather complex checkpoint regulation in particularly immune-evasive PDAC, VISTA is co-localized with PD-1/PD-L1 and other immune checkpoints in some cases of pancreatic cancer (46), correlating with impaired immune cell function.

Their synergistic role in immune evasion of pancreatic cancer has been verified in a murine model as a combined anti-VISTA and anti-PD-L1 application resulted in improved conditions (110). As a result of this co-targeting and its significant association with better disease management and longer survival, combination therapy could be an option to maximize profit of their individual effects. Moreover, expression rates may be used to predict therapeutic outcome.

Hou et al. shared the concept of macrophage-expressed VISTA playing an important role in immune evasion of pancreatic cancer: VISTA expression is predominantly higher on CD68⁺ macrophages than on CD3⁺ T cells and CD19⁺ B cells.

Recently, anti-VISTA antibody has been shown to significantly reduce the number of liver metastases in PDAC, explained by improved phagocytic ability of the macrophages. The anti-tumor immunity following anti-VISTA treatment is suspected to be a consequence of altered macrophage polarization towards the inflammatory M1 phenotype (43), as VISTA's biological function in pancreatic cancer is still unclear (106).

Beyond that, targeting the checkpoint molecule CD47 led to similar results in a mouse model of PDAC, as CD47 on cancer cells inhibits macrophage phagocytosis, causing M2 macrophage polarization (111). Checkpoint blockade provided remarkable immune reaction against pancreatic tumor cells, in particular when synergistically targeting CD47 and PD-L1.

Comparing the influence of checkpoint molecules on macrophages in colorectal and pancreatic cancer is intricate as a consequence of macrophage heterogeneity between diseases and moreover, lack of extensive systematic analyses. Despite evidence of similar effects for PD-1 and CD47 causing pro-tumor macrophage polarization, data regarding VISTA on colorectal cancer is not yet available.

Glioblastoma

Glioblastoma is characterized by severe brain edema, necrosis, as well as midline shift. Mid-survival rates are about 1 year under treatment, since surgical resection is impossible and radio-chemotherapy provides insufficient results. Unfortunately, checkpoint inhibition as glioblastoma treatment has been rather unsuccessful and does not show significant advantages over existing therapeutic options (37, 112).

Nevertheless, findings of a recent study (37) indicate that immune checkpoints do play a significant role in the pathology of glioblastoma and might be a promising therapeutic approach if targeted specifically. In cases of glioblastoma multiforme (GBM), a synergistic cancer killing effect of rapamycin and hydroxychloroquine (RQ) was reported. This is explained by RQ causing TAM reprogramming from M2-equivalent pro-tumor to inflammatory M1 polarization. Microglial cells function as macrophages of the brain and similarly present either a neuroprotective or neurotoxic phenotype in the tumor microenvironment, depending on environmental stimuli. Transitioning from minimal immune-activated TAM phenotype leads to enhanced phagocytosis levels in tumor-associated microglia (49), which results in increased immune responses and improved checkpoint blockade targeting PD-1/PD-L1 (52). In addition, RQ combined with PD-1-checkpoint inhibition enhances the intra-tumoral M1/M2 ration, CD8/CD4 ratio, and the phagocytic ability.

The observed change in macrophage type can further be explained by RQ lowering the expression of CD47 and its ligand SIRP α on malignant cells and macrophages. Zhang et al. showed that inhibiting the CD47-SIRP α pathway results in improved anti-cancer immune responses in GBM as CD47 and SIRP α interaction typically restrict phagocytic ability of macrophages (M1) (53). This restriction of microglial phagocytosis is due to CD47 executing a "don't eat me" signal in its interaction with SIRP α on malignant cells (16). Other research groups (17, 53, 54) further report that inhibiting CD47 on murine macrophages in

glioblastoma results in an elevated M1:M2 ratio and thereby an inflammatory immune reaction against tumor cells. Given this information, CD47 could be used to predict checkpoint therapy outcome. In another recent glioma mouse model, CD47-checkpoint inhibition provided effective anti-tumor immunity in five aggressive pediatric brain cancers by enhancement of CD8⁺ T cell priming (50). This results from improved antigen presentation, which is probably in part caused by enhanced M1 microglia levels.

Goswami et al. examined CD73 as a checkpoint molecule often co-expressed on CD68⁺ macrophages in GBM and found CD73⁺ macrophages to be resistant to PD-1 checkpoint inhibition in glioblastoma (51). It is further shown that they promote tumor expansion through maintaining an immunosuppressive environment in GBM (55, 113). Upon investigating the immune profile in glioblastoma in either CD73⁺ or CD73-deficient mice, it became apparent that significantly more inducible nitric oxide synthase-positive (iNOS⁺) immunostimulatory macrophages than CD206⁺ immunosuppressive macrophages could be found in CD73-deficient mice. These findings of co-expressed molecules on CD73⁺ macrophages, that indicate functional characteristics but do not represent other macrophage subtypes, are contrary to what is detected in wildtype mice. It can therefore be assumed that CD73 contributes to mediating the shift in macrophage phenotypes in glioblastoma towards a pro-tumor environment (M2).

Investigation of checkpoint inhibition of PD-1 and CTLA-4 on their own as well as in combination in wildtype and CD73-deficient mice confirmed the hypothesized role of CD73 in GBM: Therapeutic outcome was superior when both checkpoints were targeted in combination as opposed to single administration, which seems plausible as they are often co-expressed in glioblastoma. Particularly improved immune response could be detected when checkpoint blockade was applied to CD73-deficient mice that are already associated with macrophages of anti-tumor immune phenotype (51).

PD-1 blockade itself only affected tumor infiltrating lymphocytes at a low level and had basically no effect on the mostly CD73⁺ myeloid cells in the tumor microenvironment of glioblastoma. Nevertheless, immune blockade of CD73 aiming to alter macrophage polarization in combination with inhibition of CTLA-4 and PD-1 to enhance T cell infiltration will favorably change the results of checkpoint therapy and most likely provide successful outcomes for GBM patients. In fact, an anti-CD73 antibody has already been proven to be beneficial in preclinical and early clinical studies (56, 57).

It is yet to be remembered that immune regulation in glioblastoma is presumably more complicated than what can be assumed at the current level of knowledge. Hence, more information is constantly gained and needs to be considered in analysis of GBM immunity. As an example, IL-12 is shown to improve immune reaction in a murine glioblastoma model (58). Triple therapy targeting IL-12, CTLA-4, and PD-1 ultimately even led to full eradication of glioma in mice because of induced M1 polarization in TAMs (59, 60). Anyhow, as the dominating immune cells at 30–50% in GBM, macrophages represent promising targets for anti-cancer immunotherapy such as

checkpoint inhibition (59). Undeniably, it is essential to expand the current knowledge about expression and co-expression of relevant immunomodulatory molecules on macrophages in GBM to allow establishment of sufficient therapeutical approaches.

Finally, it can be concluded that targeting immunoregulatory molecules on defined cells, whose influence on patients' cancer is known, and where necessary in specific combinations, may serve as a more controlled approach to checkpoint inhibition. It therefore seems possible to achieve precise anti-tumor immunity while reducing the frequency and intensity of adverse autoimmune reactions.

IMMUNE CHECKPOINT MOLECULES IN INFECTIOUS DISEASES

Co-regulatory molecules on macrophages not only play a major role in cancer but also contribute to the development and progression of infectious diseases. Therefore, we have reviewed their importance in chronic viral infections.

HBV and HCV Infections

The characteristic dysfunctional immune response in hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) infection allows acute inflammation as well as chronification of these diseases (61). Patients have a particularly high risk for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), which explains the necessity of optimized treatment options (62, 63).

It is well known that Kupffer cells (KC) as macrophages of the liver induce immune responses to eliminate the virus in acute hepatitis. Though, they hold a dual role in HBV and HCV infection inasmuch as they further initiate immune toleration to limit excessive inflammation, ultimately facilitating hepatitis chronification (114, 115). Unlike acute hepatitis, such dysfunction of CD14⁺ monocytes and macrophages in chronic viral infections is due to increased levels of checkpoint molecules (61, 64). Moreover, HBV⁺ and HCV⁺ macrophages express the M2 immune profile associated with significant decrease of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF α , and IL-12) (64, 65). This macrophage phenotype results in impairment of the host immune response and promotes viral persistence, whereas M1 polarization correlates with pathogen clearance and higher survival rates.

Regarding specific checkpoint molecules in the pathophysiology of these infections, PD-1 and Tim-3 are already shown to inhibit production of inflammatory IL-12 on monocytes and macrophages (64), which explains why HCV-infected macrophages shift towards M2 after checkpoint expression (66). Consequently, increased levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 further contribute to the "pro-disease" M2 immune profile, ultimately facilitating viral persistence (67). Furthermore, administration of anti-PD-1 antibodies augments IL-12 production by macrophages in HCV-infected patients, likely inducing a shift towards the inflammatory M1 immune profile (68). An even higher benefit is seen after combination of standard antiviral therapy and PD-L1 blockade as

this approach significantly enhances IL-12 production, resulting in improved anti-viral immunity.

Similar results are shown for Tim-3. Regularly, its expression by macrophages and DCs is already on a high level. However, in acute HBV and HCV infection, overexpression is detected and correlates with diminished immune cell function in macrophages (64). Overexpression is further reported in chronic hepatitis B and acute-on-chronic liver failure (ACLF) (69). Such upregulated expression levels of Tim-3 promote M2 macrophage polarization, ultimately limiting immune reaction and therefore allowing disease progression (116). Consequently, Tim-3 inhibition rescues compromised immune function and enhances viral clearance (70, 116). Besides that, upregulation of both PD-L1 and galectin-9, ligands of PD-1 and Tim-3, has been reviewed on circulating CD14⁺ monocytes and KC in chronic HBV, liver cirrhosis, and HCC (2). It seems highly possible that co-expression of PD-1, Tim-3, and their ligands contributes to macrophage dysfunction and disease progression as well as chronification (71, 72).

Inhibition of these immune checkpoints represents a promising strategy in the management of HBV/HCV infection, both in single as well as combined application. In addition to current anti-viral therapy, checkpoint inhibition might ameliorate patients' wellbeing and overall survival rates, even in the chronic state.

HIV Infection

Human immunodeficiency virus (HIV) infection, another chronic viral disease, is not life-threatening in itself, rather HIV-provoked immunosuppression is the main concerning aspect, because it facilitates subsequent infections that can be fatal. Most of the infected immune cells are eliminated except for macrophages in which HIV survives and that are consequently used as virus reservoirs (73). Hence, there is great need for innovative treatment options focusing on macrophages as virus targets to prevent long-term infection with high viral reproduction (74, 75).

Closer examination of immune checkpoints on HIV⁺ macrophages highlights that PD-1 and its ligands are of particular importance. In rhesus macaques suffering from simian immunodeficiency virus (SIV), the quantity of PD-1⁺ alveolar macrophages (AM) is shown to directly correlate with virus severity, as TNF α expression levels and antibody-dependent phagocytosis (ADP) are drastically reduced in PD-1⁺ AM compared to a PD-1-deficient population. Therefore, it can be assumed that PD-1 expression contributes to macrophage shift towards the anti-inflammatory M2 immune phenotype, allowing HIV to persist (74).

In reaction to HIV virion exposure, PD-1 ligands, especially PD-L1, are increased on macrophages. However, the ligands probably serve different functions as PD-1-mediated expression of anti-inflammatory IL-10 further enhances PD-L1 expression levels, whereas PD-L2 is upregulated following IL-10 blockade (76). It therefore seems possible that dysfunction of macrophages in HIV/SIV infection is because of increased PD-1 and PD-L1 expression, and less likely caused by PD-L2 (74), similar to what is seen in SIV-infected T cells (117). PD-1 blockade on immune cells results in stronger anti-viral immune responses to SIV due to intensified phagocytosis by macrophages (74). Checkpoint

inhibition of PD-L1 also causes temporary viral control throughout administration (118). These results imply that PD-1 contributes to substantial alteration of macrophage immune phenotype and morphology, although it cannot explain the complex modulation of HIV infection in all aspects. Certainly, PD-1 ligands are also well involved, but to a lesser extent than PD-1.

Regarding co-regulatory receptors other than PD-1 in HIV⁺ macrophages, there is evidence for Tim-3 inhibiting the release of HIV-1 protein. Besides that, Tim-3 expression results in an inflammatory immune reaction, eventually decreasing viral load; whereas, checkpoint blockade of Tim-3 reinforces the production of HIV (77). Bharaj et al. further reviewed immune modulation by VISTA in HIV infection. Strong upregulation of VISTA on HIV⁺ monocytes causes enhanced secretion of anti-inflammatory cytokines, leading to limited anti-viral immune reaction (78).

Consequently, it is possible to say that disease progression, at least in part, depends on the expression of co-regulatory receptors on infected macrophages. Possible therapeutic interventions for HIV infection might be inhibition of PD-1 and VISTA, stimulation of Tim-3 expression, as well as combinations of the aforementioned factors.

Influenza A Type H1N1

Besides these significant effects of immune checkpoints in chronic infection, their importance in acute viral infection should also be emphasized. Influenza A infection, an acute respiratory disease, is characterized by inflammation of the upper respiratory tract to varying clinical severity and causes seasonal endemic infections. Regular immune response after viral infection involves upregulation of primarily macrophage-controlled pro-inflammatory cytokines and thereby allows viral clearance.

During Influenza virus infection, enhanced secretion of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ on macrophages is observed, which further increases Tim-3 expression (79). Afterwards however, Tim-3 contributes to a change in macrophage phenotype towards the anti-inflammatory, "pro-viral" M2 type. The resulting minimal macrophage immunity allows persistence of influenza infection (80, 81). By contrast, suppressing the inhibitory function of Tim-3 *via* L3G (a monoclonal antibody against Tim-3) reinforces the production of anti-inflammatory mediators in macrophages and T cells (79). These inflammatory mediators then again activate macrophages, ultimately limiting infection in immune cells.

Consequently, Tim-3 contributes to better understanding of Influenza infection, emphasizing the therapeutic potential of Tim-3 checkpoint blockade.

Tuberculosis

Co-regulatory receptors also play an essential role in bacterial infections as explained by means of tuberculosis (TB). Overall, the global TB incidence increases while simultaneously an increasing number of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) variants occur, resulting in failure of the standard quadruple therapy. Therefore, the antibiotic therapy management urgently needs to be modified (82, 83).

Tuberculosis is a unique bacterial infection as MTB is often not affected by phagocytosis and actually continues to survive and multiply inside macrophages, causing reactivation several years later. Therefore, it is challenging to assume that M1 macrophage polarization is directly followed by pathogen clearance and disease regression, as is seen in most other diseases. It should also be considered that not all macrophages are MTB-infected at the same time; hence, macrophage killing has both beneficial and detrimental effects on patients' disease course. Thus, various effects are shown for specific immune checkpoints regulating TB infection.

Following upregulation of IFN- γ at the site of TB lesions, macrophages are polarized towards the inflammatory M1 phenotype owing to downregulation of M2-associated CD16 and CD163. These M1 macrophages show increased expression levels of PD-1 and its ligand PD-L1 and are highly susceptible to CD8⁺ T cell cytotoxicity (119). CD8⁺ T cell-caused macrophage killing further results in bacterial clearance, thereby improving patients' condition. Such cytotoxicity against macrophages can be enhanced by PD-L1 blockade, but it is only effective on IFN- γ -activated macrophages (119). Therefore, ICI of PD-(L)1 presents a potential therapeutical option. Similar findings are reported in macrophages of PD-1-deficient mice as pathogen clearance and antigen presentation are limited, ultimately resulting in high bacterial load, focal necrosis, and low levels of infiltrating immune cells (84, 120). Consequently, PD-1⁺ mice infected with TB show higher survival rates owing to improved bacterial control (85). Besides that, however, PD-1 expression is shown to correlate with reduced levels of macrophage phagocytosis and limited cytotoxicity, resembling the pro-disease M2 phenotype (74). Furthermore, inhibition of both PD-1 and PD-L1/-L2 significantly augments macrophage phagocytosis in active TB, likely due to a macrophage polarization shift towards the M1 type (86). These controversial results emphasize the need for further investigation, especially regarding the unique role of the checkpoint molecule and its ligands.

Sada-Ovalle et al. identify Tim-3 as another even more promising immune checkpoint in the pathology of TB. Inhibition of Tim-3 increases the secretion of inflammatory cytokines such as IL-6, TNF α , and IFN- γ and also reduces production of anti-inflammatory IL-10. This results in pro-inflammatory M1 state, characterized by enhanced macrophage phagocytic activity and thereby, limited bacterial load. Tim-3-ICI has a greater impact on cytokine levels than blockade of PD-1 (121). Therefore, blockade of the Tim-3 pathway likely presents a favorable option in therapeutic management of TB. Inhibition of the Tim-3 ligand galectin-9 on monocyte-derived macrophages (MDM) leads to similarly reduced bacteremia as Tim-3-ICI, although to a lesser degree. However, blockade of both Tim-3 and PD-1 did not provide a more favorable result than blockade of Tim-3 alone; hence, Tim-3 seems much more relevant for TB development (121).

Considering the unique complexity of MTB survival in macrophages, the substantial need for innovative treatment options becomes evident. Apparently, checkpoint modulation on macrophages seems to be a potent approach for consolidating bactericidal activity and restoring innate immunity.

Sepsis

Sepsis is a systemic inflammatory pathology with high risk of subsequent organ damage and has multiple trigger factors, eventually causing excessive immune reactions. After release of pro-inflammatory cytokines, cascade-like activation of further inflammatory signaling pathways is initiated. Overall, this leads to immune dysregulation because of imbalanced anti-infective and anti-inflammatory reactions.

Focusing on macrophages in septic mice, they mostly present an anti-inflammatory phenotype (87, 122). Such M2-polarized macrophages produce high levels of immune-suppressive, anti-inflammatory mediators such as IL-10, as a reaction to PD-1 and PD-L1 expression. This correlates with the diminished ability to clear microbial invasion in septic mice, because macrophage phagocytosis is impaired (122). Thus, stimulation and overexpression of PD-1/PD-L1 in macrophages of septic patients limits pathogen clearance and contributes to disease exacerbation (88, 89).

Macrophages of PD-1-deficient septic mice, however, have better functional ability than septic wildtype counterparts. Thus, bacterial clearance is enhanced in PD-1-deficient mice owing to adequate phagocytosis and restricted production of inflammatory cytokines (122). Similar findings have been reported in a murine polymicrobial sepsis model induced by cecal-ligation and puncture (CLP). LD01 as a peptide-based PD-1 checkpoint inhibitor significantly improves survival by reducing bacterial burden. This is attributed to higher macrophage phagocytic activity. PD-1 pathway administration can be used to alter bacterial clearance, supposedly because of the change in macrophage polarity. By contrast, PD-1 (over-) expression causes sepsis progression as a result of restricted immune activation that is characteristic of the M2 macrophage profile (90).

Vu et al. explained macrophage polarity following CLP-induced sepsis in considerable detail. On day 1 post-CLP, the levels of PD-1⁺ macrophages are significantly increased, while presenting an exhausted immune phenotype similar to the M2 profile. Besides that, activated macrophages in an M1-like phenotype can only be found on day 12 post-CLP when PD-1 expression is low (91). This confirms a correlation between PD-1 overexpression and M2 macrophage phenotype in sepsis as previously suspected. It is further reviewed that macrophages from PD-1-deficient mice are resistant to sepsis-induced cellular dysfunction, characterized by diminished bacterial clearance, limited inflammatory cytokine secretion, and decreased antigen presentation (85). Therefore, PD-1-deficient murine macrophages have improved survival rates given the M1-like anti-inflammatory immune reaction (122).

Recently, equal results are presented for Kupffer cells (KCs), which are the macrophages of the liver (92). Toll-like receptor (TLR) signaling generally leads to enhanced expression levels of PD-1 in monocytes and macrophages (93). PD-1-expressing KCs show an M2 immune profile known to be rather immune-suppressive, facilitating sepsis progression, as endogenous immune responses are downregulated. However, PD-1-deficient mice showed significantly reduced tissue bacterial

burden, lower sepsis scores, and overall reduced disease severity, which can be attributed to M1-like KC phagocytic activity. Similar findings were reported after anti-PD-1 checkpoint therapy in mice with liver injury, strongly correlating with improved KC bacterial elimination and further providing protection from sepsis progression.

These results indicate that PD-1 and its ligands have a massive impact on macrophage function and consequently also on immune reaction to sepsis. Accordingly, checkpoint inhibition presents a promising therapeutic intervention.

CO-REGULATORY RECEPTORS IN INFLAMMATION AND AUTOIMMUNITY

Multiple Sclerosis and Autoimmune Encephalomyelitis

It has recently become increasingly apparent that apart from cancer and infectious diseases, immune checkpoint molecules are also very significant in inflammatory autoimmune conditions.

Chronic central nervous system (CNS) inflammation results in a variety of neurological symptoms that can until now, only be treated symptomatically. Only minor levels of peripheral immune cells are found in healthy brain parenchyma. In multiple sclerosis (MS) lesions, microglia make up around half of the immune cells and are considered functionally analogous to macrophages. Microglial cells promote MS progression as they are essential for myelin phagocytosis, release of pro-inflammatory mediators as well as antigen presentation (94). Therefore, they display a promising therapeutic target in inflammatory brain diseases (94, 95).

Taking a closer look at specific immune checkpoints in the regulation of inflammatory CNS conditions, microglia are shown to highly express VISTA under physiological conditions. Although VISTA's function in CNS immune cells are currently not known, its expression is known to facilitate phagocytosis (96) and leads to increased cytokine production (78) and chemotaxis (97) in microglia. While this effect seems to be similar to M1 polarization, different from other diseases, categorizing MS microglia as M1 or M2 is still debatable and has not been useful to date because of functional discrepancies in managing local inflammation (94). Nevertheless, dysregulated VISTA expression affects microglial immune function by inhibiting efferocytosis (96), but overexpression of VISTA on human macrophages enhances bactericidal immunity by stimulating production of inflammatory cytokines (78).

In an MS mouse model of autoimmune encephalomyelitis (EAE) as well as in human chronically active MS lesions, VISTA expression in macrophages is impaired (98, 99). Likewise, inhibition of VISTA causes deteriorated autoimmunity in EAE (100, 123) *via* upregulation of phagocytosis and diminished cytokine secretion (99). These data demonstrate that reduced levels of VISTA contribute to MS disease progression by affecting immune responses, especially microglial phagocytosis (124). Depending on the type of MS lesions as well as their

microenvironment, microglia show different reactions and need to be further categorized.

Moreover, the PD-1 pathway generally modulates synaptic transmission, plasticity, and general neuronal function (101, 102). In MS specifically, PD-1/PD-L1 signaling changes microglial phenotype towards an anti-inflammatory type and thereby facilitates anti-disease polarization, similar to the M2 phenotype (103). Induction of such an M2-like immune profile limits production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12, which further suppresses immune reaction and hinders MS progression (68). However, in PD-L1-deficient mice a compensatory increase of PD-1 and PD-L2 expression is detected (104), suggesting further regulatory mechanisms regarding the PD-1 axis and its ligands.

Opposing effects are shown for CD47, another recently discovered immune checkpoint of importance in MS pathology (105). By interaction with its ligand SIRP α , CD47 potently inhibits microglial phagocytosis (as previously seen on macrophages) in a variety of other diseases. In MS specifically, CD47 expression is upregulated; hence, decreased phagocytosis allows disease progression.

In summary, CD47 immune regulation in MS and EAE is entirely different from other immune checkpoints, which tend to be upregulated during inflammatory CNS processes. Contrary to the downregulated expression of VISTA and PD-1, that would need stimulation to improve disease condition, limited or no expression of CD47 seems to be a feature of anti-inflammatory state and healthy brain condition; therefore, CD47-ICI offers a promising therapeutic approach.

Atherosclerosis

Atherosclerosis is a multifactorial disease characterized by vascular damage in all three layers of the arterial walls and lipid accumulation containing malfunctioning macrophages. These so-called foam cells express a wide range of pro-atherogenic cytokines promoting destabilization and growth of atherosclerotic lesions, eventually causing lesion rupture and subsequent cardiac diseases (125, 126).

In general, macrophages present an immense functional heterogeneity of affecting local inflammation in atherosclerosis. Because phagocytosis plays a central role in the pathogenesis, and change of macrophage phenotype is reversible, the simplistic approach of classifying macrophages as M1 or M2 polarized is very inaccurate (127). Instead, alternative categorizations are needed to consider all diverse aspects of macrophage phenotypes.

Examination of specific immune checkpoints in atherosclerosis has shown that CD47 is critically important in the regulation of macrophage immune reactions. Reacting to TNF α - and NF κ B-mediated cell activation, unengulfed macrophages in an inflammatory state express CD47 (128). After interaction with ligand SIRP α , effective phagocytosis is constrained and allows disease progression, representing a change towards a pro-atherogenic phenotype (126). It is still unclear whether necroptotic macrophages in atherosclerosis also express CD47, which restricts phagocytosis and thereby promotes disease progression (126). Moreover, expression of

CD47 and SIRP α is shown to be significantly higher in apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) mice than wildtype mice, and positively correlates with the expression of M2-associated markers (e.g., Mrc1) (129). Therefore, it seems that the CD47 expression contributes to the characteristic anti-inflammatory immune profile favoring dyslipidemia and atherosclerosis in ApoE deficiency.

By contrast, limited interaction with SIRP α on macrophages in the aorta of such ApoE^{-/-} mice results in higher levels of phagocytosis (129). Anti-CD47 treatment in a mouse model of atherosclerosis also leads to significantly improved efferocytosis, increased clearance of apoptotic cells, and further reduced size of atherosclerotic lesions (128). Therefore, blockade of the CD47-SIRP α axis stands out as a novel therapeutic opportunity to enhance microglial efferocytosis and prevent disease progression.

Focusing on the PD-1 axis, both PD-1 and PD-L1 are less expressed on myeloid DCs and T cells in patients suffering from coronary artery disease (130). These reduced levels correlate with enhanced pro-inflammatory cytokine production. It is also known that in hypercholesteremic, LDL receptor-deficient (LDLR^{-/-}) mice, PD-L1 and PD-L2 are upregulated on macrophages in aortic lesions (131); whereas, PD-1 is overexpressed on aortic T cells (132). Vascular lesions in LDLR^{-/-} PD1^{-/-} mice contain many immune cells that produce particularly high levels of TNF α , contributing to pro-atherogenic immunity. Further, significantly intensified atherosclerosis condition is observed in LDLR^{-/-} mice after PD-1 blockade therapy (132, 133). These findings substantiate that PD-1 regulation affects the phenotypic and functional plasticity of macrophages in atherosclerosis. Nevertheless, further research is needed, with particular focus on the influence of PD-1 ligands on immune regulation.

Likewise, substantial impact is shown for Tim checkpoint pathways. On hypercholesteremic LDLR^{-/-} mice displaying the characteristic pro-atherogenic phenotype, checkpoint blockade of Tim-3 promotes early as well as advanced atherosclerosis (133, 134). Further examination showed that mice deficient in Tim-4 present dysfunctional macrophages that are unable to perform phagocytosis of apoptotic bodies (135). Similarly, mice treated with an anti-Tim-4 antibody have limited efferocytosis performance, contributing to enlargement and infection of atherosclerotic lesions. It can therefore be concluded that high level of Tim protein expression ultimately leads to limited phagocytosis and lower disease severity.

Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein (GITR) is mainly expressed in human atherosclerotic lesions containing foam cells. Following GITR/GITR-L interaction, human and mouse macrophages produce inflammatory cytokines such as TNF α (136, 137), increasing macrophage function and thereby facilitating disease progression in atherosclerosis. In contrast to the correlation of GITR with disease severity, GITR deficiency on macrophages reduces inflammation and therefore improves condition of atherosclerotic mice (138). This effect is even more significant on ApoE^{-/-} mice, in which deficiency of GITR not only impairs expression of inflammatory cytokines but also reduces reactive oxygen species and minimizes monocyte recruitment to the

endothelium (139). Thus, GITR checkpoint inhibition offers substantial improvement for patients suffering from severe atherosclerosis; hence, this approach stands out as a promising immunotherapeutic strategy (140).

Although it is challenging to declare specific treatment approaches given that inflammation and phagocytosis are part of disease pathology, stimulation of PD-1/PD-L1 and Tim-3/-4 as well as checkpoint inhibition of CD47/SIRP α and GITR/GITR-L seem to be promising therapeutic options, preventing subsequent cardiovascular pathologies.

Type 1 Diabetes

Type 1 diabetes is defined by autoimmune destruction of the insulin-producing beta cells of the pancreas, resulting in micro- and macroangiopathies that cause severe organ damage. Because of secretion of inflammatory cytokines, M1 polarized macrophages phagocytose pancreatic islet cells and thus contribute to disease progression (141, 142).

In a Streptozocin (STZ) mouse model, reduced levels of CD47 were found in the islet cells of STZ-treated mice, consequently followed by reduced interaction with ligand SIRP α (143). CD47 as a “don’t eat me” signal inhibits macrophage-mediated phagocytosis of endogenous cells (144, 145); hence, reduced levels of CD47 and SIRP α result in enhanced macrophage activity and thereby increased disease burden, compared to healthy mice. Furthermore, CD47 inhibition of macrophages also allows progression of autoimmune diabetes, whereas augmenting expression levels presumably improves survival, as CD47 represents a protective agent of pancreatic islet beta cells in inflammation (143, 146).

PD-1-mediated signaling in macrophages similarly contributes to *in situ* immune regulation of the pancreas. Thus, impaired PD-1-PD-L1 interaction and checkpoint inhibition are major trigger factors for disease exacerbation, especially in individuals suffering from β -cell autoimmunity (147).

At the moment, it seems that combined stimulation of the CD47 and PD-1 pathways with agonist antibodies might be a powerful treatment for type-1 diabetes by manipulating substantial features of macrophages so that characteristic autoimmune destruction of pancreatic islet cells is prevented.

CONCLUDING REMARKS AND NEW DIRECTIONS

Checkpoint modulation is a highly promising strategy to treat cancer pathologies, and its potential is being extensively researched. This allows the development of alternative therapeutical approaches, continuously improving current disease management of various malignant diseases. However, there is still a great need for further examination focusing on different checkpoint molecules and especially their cell-specific influences on underlying pathologies.

It is widely known that expression of certain checkpoint molecules has an influence on immune cells, e.g., T cells. In many diseases,

macrophages, in particular, are crucial due to their impact on mobilizing both innate and adaptive immunity, leading to eradication of pathogens. Further convertible M1 and M2 macrophage profiles determine disease development and possible regressions. The focus of checkpoint therapy should thus be extended and include reprogramming of macrophages to enhance immunity in order to destroy disease-causing cells or harmful microorganisms.

Using immune checkpoint molecules as predictive biomarkers on macrophages for malignant, infectious, and autoimmune diseases would allow individual and highly-specific therapeutic options based on diagnostic findings. Such personalized treatments will most likely be superior to the existing broad approaches. However, as immune checkpoints show remarkable functional heterogeneity amongst different diseases and cell types, these diverse pathophysiologic mechanisms have to be considered to achieve successful outcomes.

On the one hand, checkpoint inhibitors are not cell-type specific pharmaceuticals at the moment, resulting in insufficient clinical outcomes for malignant diseases because of inadequate anti-tumor immunity. Often times, even if the cancer burden is reduced, ICI is associated with intolerable suffering due to the severe side effects. On the other hand, only inhibition of immune checkpoints is performed, despite the fact that stimulation of checkpoint expression also seems to be a powerful immunotherapeutic strategy, mostly for use in cases other than malignancies. Even combining inhibition and stimulation of certain disease-relevant checkpoints appears to be beneficial from our perspective.

Nonetheless, paying close attention to the possible reciprocal interaction of checkpoint molecules is essential. As broad inhibition of many checkpoints on all immune cells triggers too many uncontrollable regulations, most of them also currently unidentified, it is necessary to define the exact checkpoints on a specific cell type for therapeutic manipulation. Such specification is inevitable to avoid situations in which these pathways affect each other, and do not allow a precise and foreseeable modulation of corresponding diseases and cause more severe side effects. We are convinced that up- or downregulation of immune checkpoints should ultimately follow cell-specific expression and impact on pathophysiology, considering possible synergisms with further checkpoint molecules. Regarding this context, it seems useful to reflect generally accepted findings of checkpoint molecules on macrophages in e.g., malignant diseases, to comprehend underlying regulatory mechanisms.

In cancer, an insufficient reaction to checkpoint inhibitor therapy can be explained by a low number of tumor-infiltrating T cells, macrophages, or other immune cells (5). However, it can also be caused by upregulation of alternative checkpoint pathways (10). Effective treatment is therefore only possible if the targeted cells express the exact checkpoint molecules that are supposed to be blocked, highlighting the importance of checkpoint expression analysis prior to therapeutic interventions.

Besides resistance to therapy, side effects are of undeniable importance in the administration of immune checkpoint inhibitors. These immune-related adverse events (IRAE) are mostly inflammatory reactions such as hypophysitis, encephalitis, myocarditis, hepatitis, pneumonitis, type 1 diabetes, colitis, myositis,

dermatitis, as well as thyroid dysfunction, and commonly occur during combined therapeutical approaches. Owing to synergisms in coreulatory pathways (3), successful reduction of disease burden correlates strongly with worse side effects. Anyhow, adverse inflammatory reactions can also be considered evidence for augmented immune activation against malignancy. Targeting single or multiple immune checkpoints cell-type-specifically on macrophages generally seems to be a more promising way to reduce disease burden and might also limit occurrence and severity of adverse events.

Furthermore, it is important to consider that adverse immune reactions caused by treatment against a disease may be therapeutically beneficial for a different disease and vice versa. As an example, treatment with an inhibitor of checkpoint X on a specific cell type against a defined cancer triggers an autoimmune reaction (e.g., acute hepatitis), implying that for this specific autoimmune condition, stimulation of checkpoint X on the exact cell type may be a favorable treatment option. Then again, for patients at risk for hepatitis, blockade of this checkpoint X should be avoided.

To conclude, treatment of cancer *via* blockade of co-regulatory pathways is already a highly promising approach. Nevertheless, there is more therapeutic potential for this specific immune-regulating group of molecules. Hence, infections affect cancer and vice versa, and regulation *via* immune checkpoints is extremely relevant for both pathologies and may be used for treatment of various acute and chronic infectious diseases as well. Similar immunoregulatory patterns can be adapted for further diseases to establish treatments based on comparable approaches.

Last, there are many diseases in which immune checkpoints seem to be highly important, e.g., parasitic infections such as helminthiasis, toxoplasmosis, and malaria (8, 148, 149), yet further research is necessary to develop effective therapeutic approaches.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy – EXC2151 – 390873048.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the doctoral thesis of VB. Because of space restrictions, we were able to cite only a fraction of the relevant literature and apologize to colleagues whose contributions might not be appropriately acknowledged in this review.

REFERENCES

- Sharma P, Allison JP. The Future of Immune Checkpoint Therapy. *Science* (2015) 348(6230):56–61. doi: 10.1126/science.aaa8172
- Wykes MN, Lewin SR. Immune Checkpoint Blockade in Infectious Diseases. *Nat Rev Immunol* (2018) 18(2):91–104. doi: 10.1038/nri.2017.112
- Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* (2016) 44(5):955–72. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.002
- Saccdalan DB, Lucero JA. The Association Between Inflammation and Immunosuppression: Implications for ICI Biomarker Development. *Oncol Targets Ther* (2021) 14:2053–64. doi: 10.2147/OTT.S278089
- Lei Y, Li X, Huang Q, Zheng X, Liu M. Progress and Challenges of Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade. *Front Oncol* (2021) 11:617335. doi: 10.3389/fonc.2021.617335
- Vivarelli S, Falzone L, Torino F, Scandurra G, Russo G, Bordonaro R, et al. Immune-Checkpoint Inhibitors From Cancer to COVID-19: A Promising Avenue for the Treatment of Patients With COVID-19 (Review). *Int J Oncol* (2021) 58(2):145–57. doi: 10.3892/ijo.2020.5159
- Liu C, Chikina M, Deshpande R, Menk AV, Wang T, Tabib T, et al. Treg Cells Promote the SREBP1-Dependent Metabolic Fitness of Tumor-Promoting Macrophages via Repression of CD8(+) T Cell-Derived Interferon- γ . *Immunity* (2019) 51(2):381–97.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.017
- Dyck L, Mills KHG. Immune Checkpoints and Their Inhibition in Cancer and Infectious Diseases. *Eur J Immunol* (2017) 47(5):765–79. doi: 10.1002/eji.201646875
- Kalbasi A, Ribas A. Tumour-Intrinsic Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(1):25–39. doi: 10.1038/s41577-019-0218-4
- Li B, Chan HL, Chen P. Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. *Curr Med Chem* (2019) 26(17):3009–25. doi: 10.2174/0929867324666170804143706
- Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring Immune-Checkpoint Blockade: Response Evaluation and Biomarker Development. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) 14(11):655–68. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.88
- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and Adaptive Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Nat Immunol* (2013) 14(10):1014–22. doi: 10.1038/ni.2703
- Corseello SM, Barnabei A, Marchetti P, De Vecchis L, Salvatori R, Torino F. Endocrine Side Effects Induced by Immune Checkpoint Inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98(4):1361–75. doi: 10.1210/jc.2012-4075
- Palmieri DJ, Carlino MS. Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity. *Curr Oncol Rep* (2018) 20(9):72. doi: 10.1007/s11912-018-0718-6
- Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and Ipilimumab Versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* (2015) 372(21):2006–17. doi: 10.1056/NEJMoa1414428
- Swoboda DM, Sallman DA. The Promise of Macrophage Directed Checkpoint Inhibitors in Myeloid Malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol* (2020) 33(4):101221. doi: 10.1016/j.beha.2020.101221
- Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) 14(7):399–416. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217
- Calabrese LH, Caporali R, Blank CU, Kirk AD. Modulating the Wayward T Cell: New Horizons With Immune Checkpoint Inhibitor Treatments in Autoimmunity, Transplant, and Cancer. *J Autoimmun* (2020) 115:102546. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102546
- Beltraminelli T, De Palma M. Biology and Therapeutic Targeting of Tumour-Associated Macrophages. *J Pathol* (2020) 250(5):573–92. doi: 10.1002/path.5403
- Sachdeva M, Arora SK. Prognostic Role of Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Excli J* (2020) 19:718–33. doi: 10.17179/excli2020-1455
- Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, et al. Induction of T-Cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol Res* (2015) 3(4):399–411. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0215
- Duan Z, Luo Y. Targeting Macrophages in Cancer Immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* (2021) 6(1):127. doi: 10.1038/s41392-021-00506-6
- Mantovani A, Allavena P. The Interaction of Anticancer Therapies With Tumor-Associated Macrophages. *J Exp Med* (2015) 212(4):435–45. doi: 10.1084/jem.20150295
- Sun NY, Chen YL, Wu WY, Lin HW, Chiang YC, Chang CF, et al. Blockade of PD-L1 Enhances Cancer Immunotherapy by Regulating Dendritic Cell Maturation and Macrophage Polarization. *Cancers (Basel)* (2019) 11(9):1400. doi: 10.3390/cancers11091400
- Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* (2014) 6(3):1670–90. doi: 10.3390/cancers6031670
- Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdynseva N, Pavlov V, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol* (2020) 10:566511. doi: 10.3389/fonc.2020.566511
- Huang YK, Wang M, Sun Y, Di Costanzo N, Mitchell C, Achuthan A, et al. Macrophage Spatial Heterogeneity in Gastric Cancer Defined by Multiplex Immunohistochemistry. *Nat Commun* (2019) 10(1):3928. doi: 10.1038/s41467-019-11788-4
- Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: An Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* (2013) 8(11):e80908. doi: 10.1371/journal.pone.0080908
- Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol* (2019) 10:1084. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084
- Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-Associated Macrophages: An Accomplice in Solid Tumor Progression. *J BioMed Sci* (2019) 26(1):78. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z
- Aras S, Zaidi MR. TAMEless Traitors: Macrophages in Cancer Progression and Metastasis. *Br J Cancer* (2017) 117(11):1583–91. doi: 10.1038/bjc.2017.356
- Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, Calvo E, Ascierto PA, Atmaca A, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination With Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* (2019) 35(2):329. doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.011
- Scodeller P, Simón-Gracia L, Kopanchuk S, Tobi A, Kilk K, Sälik P, et al. Precision Targeting of Tumor Macrophages With a CD206 Binding Peptide. *Sci Rep* (2017) 7(1):14655. doi: 10.1038/s41598-017-14709-x
- Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol* (2020) 15:123–47. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
- Hoves S, Ooi CH, Wolter C, Sade H, Bissinger S, Schmittnaegel M, et al. Rapid Activation of Tumor-Associated Macrophages Boosts Preexisting Tumor Immunity. *J Exp Med* (2018) 215(3):859–76. doi: 10.1084/jem.20171440
- O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, Koebel CM, Arthur C, White JM, et al. Cancer Immunoediting by the Innate Immune System in the Absence of Adaptive Immunity. *J Exp Med* (2012) 209(10):1869–82. doi: 10.1084/jem.20112738
- Hsu SPC, Chen YC, Chiang HC, Huang YC, Huang CC, Wang HE, et al. Rapamycin and Hydroxychloroquine Combination Alters Macrophage Polarization and Sensitizes Glioblastoma to Immune Checkpoint Inhibitors. *J Neurooncol* (2020) 146(3):417–26. doi: 10.1007/s11060-019-03360-3
- Ma Q, Liu J, Wu G, Teng M, Wang S, Cui M, et al. Co-Expression of LAG3 and TIM3 Identifies a Potent Treg Population That Suppresses Macrophage Functions in Colorectal Cancer Patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2018) 45(10):1002–9. doi: 10.1111/1440-1681.12992
- Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology* (2018) 85(1-2):72–84. doi: 10.1159/000486721
- Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 Expression by Tumour-Associated Macrophages Inhibits Phagocytosis and Tumour Immunity. *Nature* (2017) 545(7655):495–9. doi: 10.1038/nature22396
- Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol* (2019) 40(4):310–27. doi: 10.1016/j.it.2019.02.003

42. Ho TTB, Nasti A, Seki A, Komura T, Inui H, Kozaka T, et al. Combination of Gemcitabine and Anti-PD-1 Antibody Enhances the Anticancer Effect of M1 Macrophages and the Th1 Response in a Murine Model of Pancreatic Cancer Liver Metastasis. *J Immunother Cancer* (2020) 8(2):e001367. doi: 10.1136/jitc-2020-001367
43. Hou Z, Pan Y, Fei Q, Lin Y, Zhou Y, Liu Y, et al. Prognostic Significance and Therapeutic Potential of the Immune Checkpoint VISTA in Pancreatic Cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2021) 147(2):517–31. doi: 10.1007/s00432-020-03463-9
44. Sugimura-Nagata A, Koshino A, Inoue S, Matsuo-Nagano A, Komura M, Riku M, et al. Expression and Prognostic Significance of CD47-SIRPA Macrophage Checkpoint Molecules in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* (2021) 22(5):2690. doi: 10.3390/ijms22052690
45. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, et al. The CD47-Signal Regulatory Protein Alpha (SIRPα) Interaction Is a Therapeutic Target for Human Solid Tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109(17):6662–7. doi: 10.1073/pnas.1121623109
46. Blando J, Sharma A, Higa MG, Zhao H, Vence L, Yadav SS, et al. Comparison of Immune Infiltrates in Melanoma and Pancreatic Cancer Highlights VISTA as a Potential Target in Pancreatic Cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* (2019) 116(5):1692–7. doi: 10.1073/pnas.1811067116
47. Cassetta L, Kitamura T. Macrophage Targeting: Opening New Possibilities for Cancer Immunotherapy. *Immunology* (2018) 155(3):285–93. doi: 10.1111/imm.12976
48. Popp FC, Capino I, Bartels J, Damanakis A, Li J, Datta RR, et al. Expression of Immune Checkpoint Regulators IDO, VISTA, LAG3, and TIM3 in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* (2021) 13(11):2689. doi: 10.3390/cancers13112689
49. Wu SY, Watabe K. The Roles of Microglia/Macrophages in Tumor Progression of Brain Cancer and Metastatic Disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* (2017) 22:1805–29. doi: 10.2741/4573
50. von Roemeling CA, Wang Y, Qie Y, Yuan H, Zhao H, Liu X, et al. Therapeutic Modulation of Phagocytosis in Glioblastoma can Activate Both Innate and Adaptive Antitumor Immunity. *Nat Commun* (2020) 11(1):1508. doi: 10.1038/s41467-020-15129-8
51. Goswami S, Walle T, Cornish AE, Basu S, Anandhan S, Fernandez I, et al. Immune Profiling of Human Tumors Identifies CD73 as a Combinatorial Target in Glioblastoma. *Nat Med* (2020) 26(1):39–46. doi: 10.1038/s41591-019-0694-x
52. Knox T, Sahakian E, Banik D, Hadley M, Palmer E, Noonepalle S, et al. Selective HDAC6 Inhibitors Improve Anti-PD-1 Immune Checkpoint Blockade Therapy by Decreasing the Anti-Inflammatory Phenotype of Macrophages and Down-Regulation of Immunosuppressive Proteins in Tumor Cells. *Sci Rep* (2019) 9(1):6136. doi: 10.1038/s41598-019-42237-3
53. Zhang X, Chen W, Fan J, Wang S, Xian Z, Luan J, et al. Disrupting CD47-Sirpα Axis Alone or Combined With Autophagy Depletion for the Therapy of Glioblastoma. *Carcinogenesis* (2018) 39(5):689–99. doi: 10.1093/carcin/bgy041
54. Sockolosky JT, Dougan M, Ingram JR, Ho CC, Kauke MJ, Almo SC, et al. Durable Antitumor Responses to CD47 Blockade Require Adaptive Immune Stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2016) 113(19):E2646–54. doi: 10.1073/pnas.1604268113
55. Azambuja JH, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, Fernandes MC, Figueiró F, et al. CD73 Downregulation Decreases *In Vitro* and *In Vivo* Glioblastoma Growth. *Mol Neurobiol* (2019) 56(5):3260–79. doi: 10.1007/s12035-018-1240-4
56. Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, et al. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep* (2019) 27(8):2411–25.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.091
57. Antoniolli L, Novitskiy SV, Sachsenmeier KF, Fornai M, Blandizzi C, Haskó G. Switching Off CD73: A Way to Boost the Activity of Conventional and Targeted Antineoplastic Therapies. *Drug Discov Today* (2017) 22(11):1686–96. doi: 10.1016/j.drudis.2017.06.005
58. Alessandrini F, Menotti L, Avitabile E, Appolloni I, Ceresa D, Marubbi D, et al. Eradication of Glioblastoma by Immuno-Virotherapy With a Retargeted Oncolytic HSV in a Preclinical Model. *Oncogene* (2019) 38(23):4467–79. doi: 10.1038/s41388-019-0737-2
59. Ardura JA, Rackov G, Izquierdo E, Alonso V, Gortazar AR, Escribese MM. Targeting Macrophages: Friends or Foes in Disease? *Front Pharmacol* (2019) 10:1255. doi: 10.3389/fphar.2019.01255
60. Saha D, Martuza RL, Rabkin SD. Macrophage Polarization Contributes to Glioblastoma Eradication by Combination Immunovirotherapy and Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Cell* (2017) 32(2):253–67.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2017.07.006
61. Liu Y, Gao LF, Liang XH, Ma CH. Role of Tim-3 in Hepatitis B Virus Infection: An Overview. *World J Gastroenterol* (2016) 22(7):2294–303. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2294
62. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The Role of Kupffer Cells in Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections. *J Hepatol* (2014) 61(3):660–71. doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.026
63. Rehmann B, Nascimben M. Immunology of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection. *Nat Rev Immunol* (2005) 5(3):215–29. doi: 10.1038/nri1573
64. Yi W, Zhang P, Liang Y, Zhou Y, Shen H, Fan C, et al. T-Bet-Mediated Tim-3 Expression Dampens Monocyte Function During Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Immunology* (2017) 150(3):301–11. doi: 10.1111/imm.12686
65. Zhang Y, Ma CJ, Wang JM, Ji XJ, Wu XY, Jia ZS, et al. Tim-3 Negatively Regulates IL-12 Expression by Monocytes in HCV Infection. *PLoS One* (2011) 6(5):e19664. doi: 10.1371/journal.pone.0019664
66. Bility MT, Nio K, Li F, McGivern DR, Lemon SM, Feeney ER, et al. Chronic Hepatitis C Infection-Induced Liver Fibrogenesis Is Associated With M2 Macrophage Activation. *Sci Rep* (2016) 6:39520. doi: 10.1038/srep39520
67. Ahmed F, Ibrahim A, Cooper CL, Kumar A, Crawley AM. Chronic Hepatitis C Virus Infection Impairs M1 Macrophage Differentiation and Contributes to CD8(+) T-Cell Dysfunction. *Cells* (2019) 8(4):374. doi: 10.3390/cells8040374
68. Zhang Y, Ma CJ, Ni L, Zhang CL, Wu XY, Kumaraguru U, et al. Cross-Talk Between Programmed Death-1 and Suppressor of Cytokine Signaling-1 in Inhibition of IL-12 Production by Monocytes/Macrophages in Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol* (2011) 186(5):3093–103. doi: 10.4049/jimmunol.1002006
69. Rong YH, Wan ZH, Song H, Li YL, Zhu B, Zang H, et al. Tim-3 Expression on Peripheral Monocytes and CD3+CD16/CD56+natural Killer-Like T Cells in Patients With Chronic Hepatitis B. *Tissue Antigens* (2014) 83(2):76–81. doi: 10.1111/tan.12278
70. Ju Y, Hou N, Meng J, Wang X, Zhang X, Zhao D, et al. T Cell Immunoglobulin- and Mucin-Domain-Containing Molecule-3 (Tim-3) Mediates Natural Killer Cell Suppression in Chronic Hepatitis B. *J Hepatol* (2010) 52(3):322–9. doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.005
71. Huang ZY, Xu P, Li JH, Zeng CH, Song HF, Chen H, et al. Clinical Significance of Dynamics of Programmed Death Ligand-1 Expression on Circulating CD14(+) Monocytes and CD19(+) B Cells With the Progression of Hepatitis B Virus Infection. *Viral Immunol* (2017) 30(3):224–31. doi: 10.1089/vim.2016.0122
72. Nebbia G, Peppas D, Schurich A, Khanna P, Singh HD, Cheng Y, et al. Upregulation of the Tim-3/Galectin-9 Pathway of T Cell Exhaustion in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One* (2012) 7(10):e47648. doi: 10.1371/journal.pone.0047648
73. Castellano P, Prevedel L, Eugenini EA. HIV-Infected Macrophages and Microglia That Survive Acute Infection Become Viral Reservoirs by a Mechanism Involving Bim. *Sci Rep* (2017) 7(1):12866. doi: 10.1038/s41598-017-12758-w
74. Hunegnaw R, Mushtaq Z, Enyindah-Asonye G, Hoang T, Robert-Guroff M. Alveolar Macrophage Dysfunction and Increased PD-1 Expression During Chronic SIV Infection of Rhesus Macaques. *Front Immunol* (2019) 10:1537. doi: 10.3389/fimmu.2019.01537
75. Perno CF, Svicher V, Schols D, Pollicita M, Balzarini J, Aquaro S. Therapeutic Strategies Towards HIV-1 Infection in Macrophages. *Antiviral Res* (2006) 71(2–3):293–300. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.05.015
76. Rodríguez-García M, Porichis F, de Jong OG, Levi K, Diefenbach TJ, Lifson JD, et al. Expression of PD-L1 and PD-L2 on Human Macrophages Is Up-Regulated by HIV-1 and Differentially Modulated by IL-10. *J Leukoc Biol* (2011) 89(4):507–15. doi: 10.1189/jlb.0610327
77. Li M, Ablan SD, Miao C, Zheng YM, Fuller MS, Rennert PD, et al. TIM-Family Proteins Inhibit HIV-1 Release. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111(35):E3699–707. doi: 10.1073/pnas.1404851111

78. Bharaj P, Chahar HS, Alozie OK, Rodarte L, Bansal A, Goepfert PA, et al. Characterization of Programmed Death-1 Homologue-1 (PD-1H) Expression and Function in Normal and HIV Infected Individuals. *PLoS One* (2014) 9(10):e109103. doi: 10.1371/journal.pone.0109103
79. Li G, Hou C, Dou S, Zhang J, Zhang Y, Liu Y, et al. Monoclonal Antibody Against Human Tim-3 Enhances Antiviral Immune Response. *Scand J Immunol* (2019) 89(2):e12738. doi: 10.1111/sji.12738
80. Jiang X, Zhou T, Xiao Y, Yu J, Dou S, Chen G, et al. Tim-3 Promotes Tumor-Promoting M2 Macrophage Polarization by Binding to STAT1 and Suppressing the STAT1-miR-155 Signaling Axis. *Oncoimmunology* (2016) 5(9):e1211219. doi: 10.1080/2162402X.2016.1211219
81. Wang Z, Sun D, Chen G, Li G, Dou S, Wang R, et al. Tim-3 Inhibits Macrophage Control of *Listeria* Monocytogenes by Inhibiting Nrf2. *Sci Rep* (2017) 7:42095. doi: 10.1038/srep42095
82. Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, Av-Gay Y. Immuno-evasion and Immunosuppression of the Macrophage by *Mycobacterium Tuberculosis*. *Immunol Rev* (2015) 264(1):220–32. doi: 10.1111/imr.12268
83. Weiss G, Schaible UE. Macrophage Defense Mechanisms Against Intracellular Bacteria. *Immunol Rev* (2015) 264(1):182–203. doi: 10.1111/imr.12266
84. Lázár-Molnár E, Chen B, Sweeney KA, Wang EJ, Liu W, Lin J, et al. Programmed Death-1 (PD-1)-Deficient Mice Are Extraordinarily Sensitive to Tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107(30):13402–7. doi: 10.1073/pnas.1007394107
85. Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol* (2020) 11:487. doi: 10.3389/fimmu.2020.00487
86. Shen L, Gao Y, Liu Y, Zhang B, Liu Q, Wu J, et al. PD-1/PD-L Pathway Inhibits M.tb-Specific CD4(+) T-Cell Functions and Phagocytosis of Macrophages in Active Tuberculosis. *Sci Rep* (2016) 6:38362. doi: 10.1038/srep38362
87. Huang X, Chen Y, Chung CS, Yuan Z, Monaghan SF, Wang F, et al. Identification of B7-H1 as a Novel Mediator of the Innate Immune/Proinflammatory Response as Well as a Possible Myeloid Cell Prognostic Biomarker in Sepsis. *J Immunol* (2014) 192(3):1091–9. doi: 10.4049/jimmunol.1302252
88. Wakeley ME, Gray CC, Monaghan SF, Heffernan DS, Ayala A. Check Point Inhibitors and Their Role in Immunosuppression in Sepsis. *Crit Care Clin* (2020) 36(1):69–88. doi: 10.1016/j.ccc.2019.08.006
89. Monaghan SF, Thakkar RK, Tran ML, Huang X, Cioffi WG, Ayala A, et al. Programmed Death 1 Expression as a Marker for Immune and Physiological Dysfunction in the Critically Ill Surgical Patient. *Shock* (2012) 38(2):117–22. doi: 10.1097/SHK.0b013e31825de6a3
90. Phares TW, Kotraiah V, Chung CS, Unsinger J, Mazer M, Remy KE, et al. A Peptide-Based Checkpoint Immunomodulator Alleviates Immune Dysfunction in Murine Polymicrobial Sepsis. *Shock* (2021) 55(6):806–15. doi: 10.1097/SHK.0000000000001682
91. Vu CTB, Thammahong A, Leelahavanichkul A, Ritprajak P. Alteration of Macrophage Immune Phenotype in a Murine Sepsis Model Is Associated With Susceptibility to Secondary Fungal Infection. *Asian Pac J Allergy Immunol* (2019). doi: 10.12932/ap-170519-0565
92. Triantafyllou E, Gudd CL, Mawhin MA, Husbyn HC, Trovato FM, Siggins MK, et al. PD-1 Blockade Improves Kupffer Cell Bacterial Clearance in Acute Liver Injury. *J Clin Invest* (2021) 131(4):e140916. doi: 10.1172/JCI140196
93. Bally AP, Lu P, Tang Y, Austin JW, Scharer CD, Ahmed R, et al. NF- κ B Regulates PD-1 Expression in Macrophages. *J Immunol* (2015) 194(9):4545–54. doi: 10.4049/jimmunol.1402550
94. Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol* (2020) 11:374. doi: 10.3389/fimmu.2020.00374
95. Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, Fiol MP. Progressive Multiple Sclerosis: From Pathogenic Mechanisms to Treatment. *Brain* (2017) 140(3):527–46. doi: 10.1093/brain/aww258
96. Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang SY, Chu K, Hiraki M, et al. Control of Signaling-Mediated Clearance of Apoptotic Cells by the Tumor Suppressor P53. *Science* (2015) 349(6247):1261669. doi: 10.1126/science.1261669
97. Sergeant PA, Plummer SF, Pettus J, Mabaera R, DeLong JK, Pechenick DA, et al. Blocking the VISTA Pathway Enhances Disease Progression in (NZB $\times$ NZW) F1 Female Mice. *Lupus* (2018) 27(2):210–6. doi: 10.1177/0961203317716322
98. Borggreve M, Grit C, Den Dunnen WFA, Burm SM, Bajramovic JJ, Noelle RJ, et al. VISTA Expression by Microglia Decreases During Inflammation and Is Differentially Regulated in CNS Diseases. *Glia* (2018) 66(12):2645–58. doi: 10.1002/glia.23517
99. Borggreve M, Kooistra SM, Noelle RJ, Eggen BJL, Laman JD. Exploring the VISTA of Microglia: Immune Checkpoints in CNS Inflammation. *J Mol Med (Berl)* (2020) 98(10):1415–30. doi: 10.1007/s00109-020-01968-x
100. Joller N, Peters A, Anderson AC, Kuchroo VK. Immune Checkpoints in Central Nervous System Autoimmunity. *Immunol Rev* (2012) 248(1):122–39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01136.x
101. Chen G, Kim YH, Li H, Luo H, Liu DL, Zhang ZJ, et al. Author Correction: PD-L1 Inhibits Acute and Chronic Pain by Suppressing Nociceptive Neuron Activity via PD-1. *Nat Neurosci* (2019) 22(3):503. doi: 10.1038/s41593-018-0323-x
102. Jiang C, Wang Z, Donnelly CR, Wang K, Andriessen AS, Tao X, et al. PD-1 Regulates GABAergic Neurotransmission and GABA-Mediated Analgesia and Anesthesia. *iScience* (2020) 23(10):101570. doi: 10.1016/j.isci.2020.101570
103. Zhao J, Roberts A, Wang Z, Savage J, Ji RR. Emerging Role of PD-1 in the Central Nervous System and Brain Diseases. *Neurosci Bull* (2021) 37(8):1188–202. doi: 10.1007/s12264-021-00683-y
104. Li P, Mao L, Liu X, Gan Y, Zheng J, Thomson AW, et al. Essential Role of Program Death 1-Ligand 1 in Regulatory T-Cell-Afforded Protection Against Blood-Brain Barrier Damage After Stroke. *Stroke* (2014) 45(3):857–64. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004100
105. Butler CA, Popescu AS, Kitchener EJA, Allendorf DH, Puigdemílvil M, Brown GC. Microglial Phagocytosis of Neurons in Neurodegeneration, and Its Regulation. *J Neurochem* (2021) 158(3):621–39. doi: 10.1111/jnc.15327
106. Fan JQ, Wang MF, Chen HL, Shang D, Das JK, Song J. Current Advances and Outlooks in Immunotherapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer* (2020) 19(1):32. doi: 10.1186/s12943-020-01151-3
107. Xiong C, Zhu Y, Xue M, Jiang Y, Zhong Y, Jiang L, et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Aging (Albany NY)* (2021) 13(3):3386–404. doi: 10.18632/aging.202264
108. Soares KC, Rucki AA, Wu AA, Olin K, Xiao Q, Chai Y, et al. PD-1/PD-L1 Blockade Together With Vaccine Therapy Facilitates Effector T-Cell Infiltration Into Pancreatic Tumors. *J Immunother* (2015) 38(1):1–11. doi: 10.1097/CJL.0000000000000062
109. Iorio V, Rosati A, D'Auria R, De Marco M, Marzullo L, Basile A, et al. Combined Effect of Anti-BAG3 and Anti-PD-1 Treatment on Macrophage Infiltrate, CD8(+) T Cell Number and Tumour Growth in Pancreatic Cancer. *Gut* (2018) 67(4):780–2. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314225
110. Liu J, Yuan Y, Chen W, Putra J, Suriawinata AA, Schenk AD, et al. Immune-Checkpoint Proteins VISTA and PD-1 Nonredundantly Regulate Murine T-Cell Responses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 112(21):6682–7. doi: 10.1073/pnas.1420370112
111. Pan Y, Lu F, Fei Q, Yu X, Xiong P, Yu X, et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Compartmental Remodeling of Tumor-Infiltrating Immune Cells Induced by Anti-CD47 Targeting in Pancreatic Cancer. *J Hematol Oncol* (2019) 12(1):124. doi: 10.1186/s13045-019-0822-6
112. Daubon T, Hemadou A, Romero Garmendia I, Saleh M. Glioblastoma Immune Landscape and the Potential of New Immunotherapies. *Front Immunol* (2020) 11:585616. doi: 10.3389/fimmu.2020.585616
113. Yan A, Joachims ML, Thompson LF, Miller AD, Canoll PD, Bynoe MS. CD73 Promotes Glioblastoma Pathogenesis and Enhances Its Chemoresistance via A(2B) Adenosine Receptor Signaling. *J Neurosci* (2019) 39(22):4387–402. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1118-18.2019
114. Roohani S, Tacke F. Liver Injury and the Macrophage Issue: Molecular and Mechanistic Facts and Their Clinical Relevance. *Int J Mol Sci* (2021) 22(14):7249. doi: 10.3390/ijms22147249
115. Yuan F, Zhang W, Mu D, Gong J. Kupffer Cells in Immune Activation and Tolerance Toward HBV/HCV Infection. *Adv Clin Exp Med* (2017) 26(4):739–45. doi: 10.17219/acem/62759

116. Yan W, Liu X, Ma H, Zhang H, Song X, Gao L, et al. Tim-3 Fosters HCC Development by Enhancing TGF- β -Mediated Alternative Activation of Macrophages. *Gut* (2015) 64(10):1593–604. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307671
117. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated With T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature* (2006) 443(7109):350–4. doi: 10.1038/nature05115
118. Gill AL, Green SA, Abdullah S, Le Saout C, Pittaluga S, Chen H, et al. Programed Death-1/Programed Death-Ligand 1 Expression in Lymph Nodes of HIV Infected Patients: Results of a Pilot Safety Study in Rhesus Macaques Using Anti-Programed Death-Ligand 1 (Avelumab). *Aids* (2016) 30(16):2487–93. doi: 10.1097/QAD.0000000000001217
119. Suarez GV, Melucci Ganzarain CDC, Vecchione MB, Trifone CA, Marin Franco JL, Genoula M, et al. PD-1/PD-L1 Pathway Modulates Macrophage Susceptibility to Mycobacterium Tuberculosis Specific CD8(+) T Cell Induced Death. *Sci Rep* (2019) 9(1):187. doi: 10.1038/s41598-018-36403-2
120. Barber DL, Mayer-Barber KD, Feng CG, Sharpe AH, Sher A. CD4 T Cells Promote Rather Than Control Tuberculosis in the Absence of PD-1-Mediated Inhibition. *J Immunol* (2011) 186(3):1598–607. doi: 10.4049/jimmunol.1003304
121. Sada-Ovalle I, Ocaña-Guzman R, Pérez-Patrigéon S, Chávez-Galán L, Sierra-Madero J, Torre-Bouscoulet L, et al. Tim-3 Blocking Rescue Macrophage and T Cell Function Against Mycobacterium Tuberculosis Infection in HIV+ Patients. *J Int AIDS Soc* (2015) 18(1):20078. doi: 10.7448/IAS.18.1.20078
122. Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, et al. PD-1 Expression by Macrophages Plays a Pathologic Role in Altering Microbial Clearance and the Innate Inflammatory Response to Sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009) 106(15):6303–8. doi: 10.1073/pnas.0809422106
123. Wang L, Le Mercier I, Putra J, Chen W, Liu J, Schenk AD, et al. Disruption of the Immune-Checkpoint VISTA Gene Imparts a Proinflammatory Phenotype With Predisposition to the Development of Autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111(41):14846–51. doi: 10.1073/pnas.1407447111
124. Voet S, Prinz M, van Loo G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol Med* (2019) 25(2):112–23. doi: 10.1016/j.molmed.2018.11.005
125. Chineti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage Subsets in Atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* (2015) 12(1):10–7. doi: 10.1038/nrcardio.2014.173
126. Kavurma MM, Rayner KJ, Karunakaran D. The Walking Dead: Macrophage Inflammation and Death in Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* (2017) 28(2):91–8. doi: 10.1097/MOL.0000000000000394
127. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2020) 40(1):20–33. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312802
128. Kojima Y, Volkmer JP, McKenna K, Civelek M, Lusis AJ, Miller CL, et al. CD47-Blocking Antibodies Restore Phagocytosis and Prevent Atherosclerosis. *Nature* (2016) 536(7614):86–90. doi: 10.1038/nature18935
129. Chen W, Li X, Wang J, Song N, Zhu A, Jia L. miR-378a Modulates Macrophage Phagocytosis and Differentiation Through CD47-Sirp α Axis in Atherosclerosis. *Scand J Immunol* (2019) 90(1):e12766. doi: 10.1111/sji.12766
130. Lee J, Zhuang Y, Wei X, Shang F, Wang J, Zhang Y, et al. Contributions of PD-1/PD-L1 Pathway to Interactions of Myeloid DCs With T Cells in Atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* (2009) 46(2):169–76. doi: 10.1016/j.jmcc.2008.10.028
131. Gotsman I, Grabie N, Dacosta R, Sukhova G, Sharpe A, Lichtman AH. Proatherogenic Immune Responses Are Regulated by the PD-1/PD-L1 Pathway in Mice. *J Clin Invest* (2007) 117(10):2974–82. doi: 10.1172/JCI31344
132. Bu DX, Tarrio M, Maganto-Garcia E, Stavrakis G, Tajima G, Lederer J, et al. Impairment of the Programmed Cell Death-1 Pathway Increases Atherosclerotic Lesion Development and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) 31(5):1100–7. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.224709
133. Foks AC, Kuiper J. Immune Checkpoint Proteins: Exploring Their Therapeutic Potential to Regulate Atherosclerosis. *Br J Pharmacol* (2017) 174(22):3940–55. doi: 10.1111/bph.13802
134. Foks AC, Ran IA, Wasserman L, Frodermann V, Ter Borg MN, de Jager SC, et al. T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3 Acts as a Negative Regulator of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2013) 33(11):2558–65. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301879
135. Rodriguez-Manzanet R, Sanjuan MA, Wu HY, Quintana FJ, Xiao S, Anderson AC, et al. T and B Cell Hyperactivity and Autoimmunity Associated With Niche-Specific Defects in Apoptotic Body Clearance in TIM-4-Deficient Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107(19):8706–11. doi: 10.1073/pnas.0910359107
136. Kim WJ, Bae EM, Kang YJ, Bae HU, Hong SH, Lee JY, et al. Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor Family Related Protein (GITR) Mediates Inflammatory Activation of Macrophages That can Destabilize Atherosclerotic Plaques. *Immunology* (2006) 119(3):421–9. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02453.x
137. Bae EM, Kim WJ, Suk K, Kang YM, Park JE, Kim WY, et al. Reverse Signaling Initiated From GITRL Induces NF-kappaB Activation Through ERK in the Inflammatory Activation of Macrophages. *Mol Immunol* (2008) 45(2):523–33. doi: 10.1016/j.molimm.2007.05.013
138. Bosmans LA, Shami A, Atzler D, Weber C, Gonçalves I, Lutgens E. Glucocorticoid Induced TNF Receptor Family-Related Protein (GITR) - A Novel Driver of Atherosclerosis. *Vasc Pharmacol* (2021) 139:106884. doi: 10.1016/j.vph.2021.106884
139. Shami A, Atzler D, Bosmans LA, Winkels H, Meiler S, Lacy M, et al. Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor Family-Related Protein (GITR) Drives Atherosclerosis in Mice and Is Associated With an Unstable Plaque Phenotype and Cerebrovascular Events in Humans. *Eur Heart J* (2020) 41(31):2938–48. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa484
140. Tian J, Zhang B, Rui K, Wang S. The Role of GITR/GITRL Interaction in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* (2020) 11:588682. doi: 10.3389/fimmu.2020.588682
141. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, Pathogenesis and Clinical Interventions in Type 1 Diabetes. *Nature* (2010) 464(7293):1293–300. doi: 10.1038/nature08933
142. Desai S, Deshmukh A. Mapping of Type 1 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev* (2020) 16(5):438–41. doi: 10.2174/1573399815666191004112647
143. Zhang J, Tan SB, Guo ZG. CD47 Decline in Pancreatic Islet Cells Promotes Macrophage-Mediated Phagocytosis in Type I Diabetes. *World J Diabetes* (2020) 11(6):239–51. doi: 10.4239/wjdv.11.6.239
144. Barclay AN. Signal Regulatory Protein Alpha (SIRPalpha)/CD47 Interaction and Function. *Curr Opin Immunol* (2009) 21(1):47–52. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.008
145. Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, et al. Role for CD47-SIRPalpha Signaling in Xenograft Rejection by Macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104(12):5062–6. doi: 10.1073/pnas.0609661104
146. Cai Y, Yao H, Sun Z, Wang Y, Zhao Y, Wang Z, et al. Role of NFAT in the Progression of Diabetic Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* (2021) 8:635172. doi: 10.3389/fcvm.2021.635172
147. Falcone M, Foustier G. Role of the PD-1/PD-L1 Dyad in the Maintenance of Pancreatic Immune Tolerance for Prevention of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2020) 11:569. doi: 10.3389/fendo.2020.00569
148. Hwang YS, Shin JH, Yang JP, Jung BK, Lee SH, Shin EH. Characteristics of Infection Immunity Regulated by Toxoplasma Gondii to Maintain Chronic Infection in the Brain. *Front Immunol* (2018) 9:158. doi: 10.3389/fimmu.2018.00158
149. Bellanger AP, Courquet S, Pallandre JR, Godet Y, Millon L. Echinococcus Multilocularis Vesicular Fluid Induces the Expression of Immune Checkpoint Proteins In Vitro. *Parasite Immunol* (2020) 42(6):e12711. doi: 10.1111/pim.12711

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Brom, Burger, Wirtz and Schildberg. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Danksagung

Für die großartige Unterstützung bei der Entstehung dieser Promotionsarbeit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser beigetragen haben.

Zunächst möchte ich meinen Dank der Universität Bonn sowie Univ.- Prof. Dr. med. Dieter C. Wirtz aussprechen, für die Chance, in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie zu promovieren und wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln.

Ein großes Dankeschön gebührt meinem Doktorvater Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Frank A. Schildberg, Leiter der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, für die Vergabe dieses Promotionsthemas an mich. Lieber Frank, vielen Dank für dein Vertrauen, deine konstante Unterstützung, hervorragende Betreuung und unermüdliche Arbeit, ohne die diese Promotion nicht realisierbar gewesen wäre.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten Laborteam einen herzlichen Dank aussprechen, sowohl für die Einführung in die experimentelle Methodik als auch für unzählige wertvolle Diskussionen, aber vornehmlich dafür, dass ihr mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Werner Masson bedanken. Lieber Werner, danke für deine kreativen Ideen, deine unendliche Geduld, immerzu helfende Hand und motivierenden Worte in Phasen der Entmutigung.

Überdies gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht, sondern mich auch während der gesamten Promotionszeit stets bestärkt und unbedingt gefördert haben.