



Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Lehrstuhl für Unfallchirurgie: Prof. Dr. Karl-Heinz Frosch

Lehrstuhl für Orthopädie: Prof. Dr. Frank Timo Beil

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf | Martinistraße 52 | 20246 Hamburg
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie, Wirbelsäulenchirurgie

Deutsche Wirbelsäulenstiftung

Geschäftsstelle

Frau Romy Held

Parkweg 6

07751 Jena

Wirbelsäulenchirurgie

Ltd. Arzt PD Dr. Lennart Viezens
OA Dr. Georg E. J. Fritsch
OA Dr. Markus Schomacher
OA PD Dr. Malte Schröder

Martinistraße 52
20246 Hamburg

Telefon: +49 (0) 40 7410-56125
Fax: +49 (0) 407410-49338
wirbelsaeulenchirurgie@uke.de

Studienleitung:

PD Dr. med. L. Viezens

Martinistraße 52
20246 Hamburg

Telefon: +49 (0) 40 7410-56125
Fax: +49 (0) 407410-49338
l.viezens@uke.de

Abschlussbericht

Sehr geehrter Herr Dr. Klaus Schnake,

wir freuen uns darüber, Ihnen mit diesem Schreiben den Abschlussbericht zu dem durch die Deutsche Wirbelsäulenstiftung geförderten Forschungsprojekt mit dem Titel: **„Intraläsionale zytologische Diagnosesicherung bei spinaler Manifestation einer unbekanntes malignen Erkrankung und vergleichende Analyse des Immunprofils im spinalen und pelvinen Knochenmark“** übersenden zu können.

Wir bitten darum den Inhalt dieses Abschlussberichtes vertraulich zu behandeln, da eine Publikation der bislang unveröffentlichten Daten aktuell aussteht. Wir sind freuen uns über und sind dankbar für die Unterstützung durch die Deutsche Wirbelsäulenstiftung, die maßgeblich zum Erfolg des Projektes beigetragen hat

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Leon-Gordian Leonhardt

Intraläsionale zytologische Diagnosesicherung bei spinaler Manifestation einer unbekanntem malignen Erkrankung und vergleichende Analyse des Immunprofils im spinalen und pelvinen Knochenmark

1. Antragsteller

Leon-Gordian Leonhardt (geb. Köpke), Lennart Viezens, Anne Marie Asemissen

2. Projektname

Intraläsionale zytologische Diagnosesicherung bei spinaler Manifestation einer unbekanntem malignen Erkrankung und vergleichende Analyse des Immunprofils im spinalen und pelvinen Knochenmark

3. Projekt-Code der Verwaltung des Förderbetrag-Empfängers

1980/100

4. Datum des Zuwendungsbescheides

11. Dezember 2021

5. Einleitung

Hiermit berichten wir über das durch die Deutsche Wirbelsäulenstiftung geförderte Forschungsprojekt mit dem Titel: „Intraläsionale zytologische Diagnosesicherung bei spinaler Manifestation einer unbekanntem malignen Erkrankung und vergleichende Analyse des Immunprofils im spinalen und pelvinen Knochenmark“. Das Projekt beschäftigt sich übergeordnet mit der Analyse von malignen spinalen Läsionen (MSL) und gliedert sich in ein klinisches Teilprojekt und ein Teilprojekte zur Grundlagenforschung.

MSL sind eine typische Tumormanifestation bei Patient:innen mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen¹. Nicht selten sind durch sie ausgelöste Rückenschmerzen das erste Symptom der zu Grunde liegenden Erkrankung und führen so zu dessen Erstdiagnose. In Fällen, in denen durch die MSL spinale Instabilitäten sowie drohende oder manifeste neurologische Defizite ausgelöst werden, kann eine operative Therapie notwendig sein. Ein weiterer entscheidender Faktor ist neben der spinalen Versorgung die diagnostische Sicherung der zu Grunde liegenden malignen Erkrankung, um eine spezifische Therapie einleiten zu können. Goldstandard ist hierbei die Histologie^{2, 3}. Ein Problem bei der histopathologischen Analyse von knöchernen Proben aus spinalen Läsionen ist die Zeit, die für die aufwändige Prozessierung der

Proben benötigt wird⁴. Hier zeigt die zytologische Analyse gegenüber der Histologie einen Vorteil, da keine aufwendige Prozessierung notwendig und eine Probenanalyse so in kurzer Zeit möglich ist. Durch unsere Arbeitsgruppe wurde in der Vergangenheit die Analyse von simultan zur Histopathologie gewonnenen zytologischen Proben aus MSL beschrieben⁵. Ziel des klinischen Teilprojektes war die weitere diagnostische Validierung der zytologischen Evaluation von MSL bei einer bisher unbekanntem Tumorerkrankung und deren Einfluss auf die Verkürzung der Zeit bis zur Diagnosesicherung (TTD) und Einleitung einer spezifischen Tumorthherapie (TTT). Eine entsprechende Originalarbeit mit dem Titel: *“A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study”* wurde am 25.04.2024 im *Journal Cancers* publiziert⁶.

Pathophysiologisch besteht bei Patient:innen mit MSL eine Interaktion zwischen malignen Zellen, dem Knochenstoffwechsel und dem Immunsystem. Die Zusammensetzung der immunologischen Mikroumgebung bestimmt das Ansprechen auf eine Immuntherapie. Entscheidend sind hierbei vor allem die T-Zellen, die *Natural-Killer*(NK)-Zellen und die Makrophagen. MSL sind prognostisch zwar ungünstig⁷, ein gutes Ansprechen von MSL auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) ist jedoch mit einem besseren Überleben assoziiert⁸. Die Entwicklung von Resistenzen gegen ICI⁹ macht die Identifikation von neuen Immuncheckpoints (ICP) essenziell. In dieser Studie wurden daher Moleküle zweier kürzlich entdeckter Signalwege in MSL untersucht: Der T-Zell-Immunrezeptor mit Immunglobulin- und ITIM-Domäne (TIGIT) und der purinerge Signalweg, der ATP zu immunsuppressivem Adenosin abbaut^{10, 11}. Ziel war es, durch eine Vergleichsanalyse der Immunprofile des Knochenmarkes aus den MSL, Erkenntnisse über das Immunmilieu in den MSL zu gewinnen und vielversprechende neue Signalwege zur Immunmodulation in den MSL zu untersuchen. Ein entsprechendes Manuskript mit dem Titel: *„Identification of novel immune checkpoints relevant in bone metastasis-derived immune cells“* befindet sich gerade in der arbeitsgruppeninternen Revision und eine Einreichung ist für Beginn des Jahres 2025 beim *Journal Cancer Immunology, Immunotherapy* geplant.

Weiterhin haben wir uns im Rahmen des aktuellen Projektes genauer auf die Analyse von CD103⁺ tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) aus den MSL beschäftigt. CD3⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort in der Umgebung von Knochenmetastasen. Diese lassen sich einteilen in zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen. Die immunsuppressive Mikroumgebung des Knochenmarks von MSL kann die Funktion dieser Zellen jedoch beeinträchtigen und ihre tumorabtötende Wirkung verringern¹². Die effektive Rekrutierung und der Verbleib von T-Zellen im Tumor erfordern die Expression spezifischer Chemokinrezeptoren und Integrine. Vor allem das Integrin αE , auch bekannt als CD103, wurde als Schlüsselmarker

identifiziert¹³. TILs sind entscheidend für die Antitumorimmunität, wobei sich die meisten Studien auf CD103⁺CD8⁺ Zellen konzentrieren, während über CD103⁺CD4⁺ Zellen weniger bekannt ist. Die Rolle der CD103⁺ TILs im Knochenmark, insbesondere ihre Koexpression mit Markern der Immunerschöpfung wie CD39, TIGIT, dem *poliovirus receptor-related immunoglobulin domain containing* (PVRIG) und *killer cell immunoglobulin-like receptor, two Ig domains, and long cytoplasmic tail 5A* (KIR2DL5A), bleibt bislang unbeschrieben. Ein Manuskript zur Analyse der Koexpression von CD103 mit Erschöpfungsmarkern wie CD39, TIGIT, PVRIG und KIR2DL5A in MSL mit dem Titel „*Enrichment of Exhausted CD103⁺CD4⁺ T Cells in Bone Metastases Compared to Non-Malignant Controls*“ befindet sich gerade bei dem Journal *World Journal of Surgical Oncology* im Review.

Im Folgenden werden Zielsetzung, Methodik, Ergebnisse und Diskussion der jeweiligen Teilprojekte zusammenfassend dargestellt. Bzgl. des klinischen Teilprojektes bitten wir auf die entsprechende Publikation verweisen zu dürfen. Eine ausführlichere Darstellung der Teilprojekte der Grundlagenforschung wird ebenfalls im Rahmen der ausstehenden Publikationen erfolgen.

6. Zielsetzung

Zielsetzung Teilprojekt Klinik

“A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study”⁶

Siehe Publikation im Anhang⁶

Zielsetzung Teilprojekt Grundlagenforschung

“Identification of novel immune checkpoints relevant in bone metastasis-derived immune cells”

Vergleichende Analyse ausgewählter Immunzellpopulationen und vielversprechender neuer Signalwege aus MSL von Patient:innen mit soliden Krebserkrankungen oder Multiplem Myelom, um die Entwicklung neuer individualisierter immuntherapeutischer Strategien zu erleichtern.

“Enrichment of Exhausted CD103⁺ CD4⁺ T Cells in Bone Metastases Compared to Non-Malignant Controls”

Analyse der Koexpression von CD103 auf CD3⁺ T-Zellen mit Erschöpfungsmarkern wie CD39, TIGIT, PVRIG und KIR2DL5A speziell in MSL.

7. Methodik

“A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study”⁶

Siehe Publikation im Anhang⁶

“Identification of novel immune checkpoints relevant in bone metastasis-derived immune cells”

Es erfolgte die Analyse von Knochenmark aus MSL bei den folgenden Tumorentitäten: Brustkrebs (BC) (n=6), Prostatakarzinom (PC) (n=4), nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) (n=6) und Multiplem Myelom (MM) (n=10). Weiterhin erfolgte die Analyse einer nicht malignen Kontrolle (NMC) (n=10). Die Analyse wurde mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie (MFC) durchgeführt. Pro Probe wurden 3 Panels angefärbt, wobei in Panel 1 T-Zellen, in Panel 2 NK-Zellen und in Panel 3 Makrophagen charakterisiert wurden. Weiterhin erfolgte die Analyse der Proben auf Moleküle zweier kürzlich entdeckter Signalwege: TIGIT und dem purinergen Signalweg^{10,11}.

“Enrichment of Exhausted CD103⁺ CD4⁺ T Cells in Bone Metastases Compared to Non-Malignant Controls”

Es wurden Lymphozyten aus den MSL bei verschiedenen Tumorentitäten (BC (n=6), PC (n=4) und NSCLC (n=6)) sowie NMC (n=9) gesammelt. Mittels MFC wurde die Expression von CD103 und Erschöpfungsmarkern (CD39, TIGIT und PVRIG) in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht.

8. Ergebnisse

“A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study”⁶

Siehe Publikation im Anhang⁶

“Identification of novel immune checkpoints relevant in bone metastasis-derived immune cells”

Immunezellfrequenzen in den MSL

Die Immunezellfrequenzen variierten zwischen den Tumorentitäten. Im BC wurde im Vergleich zur NMC eine erhöhte Häufigkeit von CD3⁺ T-Zellen beobachtet. Die Häufigkeit von NK-Zellen war bei NSCLC im Vergleich zur NMC und zum MM erhöht. Im PC und MM zeigte sich eine höhere Frequenz von Makrophagen als bei der NMC. Subanalysen der CD3⁺ T-Zellen ergaben, dass beim PC, NSCLC und MM der Anteil der CD8⁺ T-Zellen signifikant reduziert war, während der Anteil CD4⁺ T-Zellen bei BC und MM signifikant erhöht war. Die Differenzierung der NK-Zellen wurde anhand der Kategorisierung in regulatorische CD56⁺CD16⁻ NK-Zellen und zytotoxische CD56⁻CD16⁺ sowie CD56⁺CD16⁺ NK-Zellen vorgenommen. Die Häufigkeit der zytotoxischen CD56⁻CD16⁺ NK-Zellen war bei MSL und in der NMC ähnlich. Allein beim NSCLC und MM zeigten sie sich reduziert. Für die Untergruppe der CD56⁺CD16⁺ NK-Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu war die Häufigkeit von regulatorischen CD56⁺CD16⁻ NK-Zellen beim PC, NSCLC und MM im Vergleich zur NMC signifikant erhöht. Makrophagen können grob in eher immunsuppressiv (*M2-like*) und inflammatorisch (*M1-like*) wirkende Untergruppen unterschieden werden können. Diese wurden anhand der Expression von CD163 und CD86 weiter untersucht. Im Vergleich zur NMC schien die Häufigkeit von CD86⁺CD163⁻ *M1-like* Makrophagen beim PC und MM reduziert zu sein. Im Gegensatz dazu war der Anteil der CD163⁺CD86⁺ *M2-like* Makrophagen in allen 4 Tumorentitäten im Vergleich zur NMC deutlich erhöht.

Analyse der Immuncheckpoint-Profile der T-Zellen

Die Expression der Moleküle TIGIT, PVRIG, CD226, CD39 und CD73 wurde analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens eins der untersuchten Moleküle in jeder Tumorentität häufiger exprimiert wurde, als in der NMC. Dies hängt vermutlich mit der Tumorprogression zusammen. Es waren keine eindeutigen Unterschiede in den Expressionsmustern von Proben aus soliden Tumoren oder MM feststellbar. Insgesamt wurden in den MSL charakteristische Koexpressionsmuster der Signalwege beobachtet. TIGIT wurde häufiger gemeinsam mit PVRIG,

aber auch mit CD39 exprimiert. Diese Expressionsmuster könnten auf eine funktionelle Bedeutung und vielleicht auch auf synergistische Effekte der Signalwege in Zusammenhang mit der Fehlfunktion von CD8⁺ T-Zellen während der Tumorprogression hinweisen.

Analyse der Immuncheckpoint-Profile der NK-Zellen

Die Charakterisierung von NK-Zellen zeigte, dass NK-Zellen aus MSL im Vergleich zur NMC mindestens ein Molekül aus den Signalwegen abweichend exprimieren. Auch hier gab es keinen klaren Unterschied zwischen Proben aus soliden Tumoren und Proben aus dem MM. Insgesamt wurden TIGIT und PVRIG hauptsächlich von zytotoxischen NK-Zellen exprimiert, während CD39 und CD73 vor allem von der regulatorischen NK-Zelluntergruppe exprimiert wurden.

Analyse der Immuncheckpoint-Profile der Makrophagen

Zusammenfassend zeigte sich, dass Makrophagen aus den MSL überwiegend einen M2-like Phänotyp aufweisen, der je nach Tumorentität entweder durch die Expression von TIGIT und PVRL4 oder von CD112 und CD155 gekennzeichnet ist.

“Enrichment of Exhausted CD103⁺ CD4⁺ T Cells in Bone Metastases Compared to Non-Malignant Controls”

Expression von CD103⁺ T-Zellen in MSL im Vergleich zur NMC

Wir fanden eine signifikant erhöhte Häufigkeit von CD103⁺CD3⁺ T-Zellen in MSL im Vergleich zur NMC auf ($p < 0,01$). Eine anschließende Subgruppenanalyse für die verschiedenen Tumorarten ergab, dass alle Tumorentitäten eine signifikant erhöhte Häufigkeit von CD103⁺ T-Zellen im Vergleich zu NMCs aufwiesen (NMC vs. BC $p < 0,01$, NMC vs. PC $p = 0,02$, NMC vs. NSCLC $p = 0,04$).

Subgruppenanalyse von CD103⁺CD8⁻- und CD103⁺CD4⁺-T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen aus MSL exprimierten häufiger CD103 als diejenigen aus dem NMC ($p \leq 0,01$). Im Gegensatz dazu wiesen die entsprechenden CD8⁺ T-Zellen aus MSL eine signifikant kleinere Population von CD103⁺ T-Zellen auf als die der NMC ($p \leq 0,001$). Außerdem ergab eine vergleichende Analyse des Verhältnisses von CD4⁺CD103⁺ zu CD8⁺CD103⁺ zwischen MSL und NMC ein verändertes CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis in MSL ($p < 0,01$).

Analyse der Koexpression von CD103 mit CD39, TIGIT, PVRIG und KIR2DL5A

In CD103⁺CD4⁺ T-Zellen wurden TIGIT und PVRIG im Vergleich zu CD103⁻CD4⁺ T-Zellen signifikant stärker exprimiert (TIGIT $p < 0.0001$, PVRIG $p < 0.0001$). Darüber hinaus zeigten CD103⁺CD4⁺ T-

Zellen eine deutliche Zunahme der Expression von CD39 ($p \leq 0,0001$) und KIR2DL5 ($p \leq 0,0001$). Im Gegensatz dazu wurden keine signifikanten Unterschiede in der TIGIT- und PVRIG-Expression zwischen CD103⁺ und CD103⁻CD8⁺ T-Zellen beobachtet (TIGIT $p = 0,8$, PVRIG $p = 0,6$). Ähnlich wie CD4⁻ T-Zellen wiesen CD103⁺CD8⁻ T-Zellen eine signifikant höhere Expression von CD39 und KIR2DL5 auf (CD39 $p < 0,0001$, KIR2DL5 $p < 0,01$). Bemerkenswert ist, dass TIGIT, PVRIG, CD39 und KIR2DL5 sowohl in CD4 als auch in CD8 T-Zellen eine Koexpression aufweisen.

9. Diskussion

“A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study”⁶

Siehe Publikation im Anhang⁶

“Identification of novel immune checkpoints relevant in bone metastasis-derived immune cells”

Dieses Projekt bietet einen umfassenden Überblick über die Expression neuartiger koregulatorischer Moleküle in verschiedenen, aus MSL stammenden Immunzellpopulationen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschobene Verteilung der Immunzellpopulationen und die abweichende Expression mehrerer Moleküle der TIGIT-Achse und des purinergen Signalweges deren Bedeutung für die Immunzellinteraktionen in MSL unterstreichen. Sowohl die TIGIT-Achse als auch der purinerge Signalweg erwiesen sich bei allen vier Tumorentitäten als relevant, wenn auch mit Unterschieden in der Expression, sodass eine einzel-, aber auch multispezifische Blockade einen interessanten Ansatz zur Steigerung der Anti-Tumor-Immunität in MSL darstellen könnte.

“Enrichment of Exhausted CD103⁺ CD4⁺ T Cells in Bone Metastases Compared to Non-Malignant Controls”

Dieser Projektteil liefert eine erste umfassende Analyse tumorreaktiver T-Zellen im Knochenmark bei verschiedenen Tumorarten, mit Fokus auf die Koexpression von CD103 mit neuen Erschöpfungsmarkern wie CD39, TIGIT, PVRL4 und KIR2DL5A. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Expression von CD103 in CD3⁺ T-Zellen in MSL im Vergleich zur NMC deutlich erhöht ist. Insbesondere war die CD103⁺CD4⁺ Fraktion in MSL signifikant höher, während die CD103⁺CD8⁺ Fraktion im Vergleich zur NMC reduziert ist. Wir beobachteten signifikante Unterschiede im Differenzierungsstatus von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen zwischen MSL und der NMC sowie zwischen CD103⁺- und CD103⁻ Zellen. Wichtig ist, dass die Koexpression von CD103 mit Erschöpfungsmarkern in MSL signifikant höher war, was neue Einblicke in die immunologische Landschaft in MSL bietet. Zusammenfassend zeigt dieses Teilprojekt, dass die Frequenz von

CD103⁺ T-Zellen in MSL im Vergleich zur NMC signifikant erhöht ist, mit einer deutlichen Zunahme von CD103⁺CD4⁺ Zellen und einer Verringerung von CD103⁺CD8⁺ Zellen. Das Vorherrschen von CD4⁺ Zellen in MSL zusammen mit erhöhten Erschöpfungsmarkern wie CD39 und TIGIT deutet auf eine immunsuppressive Mikroumgebung hin, die das Fortschreiten des Tumors begünstigt. Dies unterstreicht die Bedeutung einer weiteren Untersuchung des Funktionszustands von CD4⁺CD103⁺ T-Zellen in MSL, insbesondere im Zusammenhang mit Erschöpfungsmarkern, um ihre Rolle bei der Krebsprogression und das Potenzial für eine Immuntherapie besser zu verstehen.

10. Angaben wo und wann die Ergebnisse publiziert werden

Teilprojekt Klinik

Eine entsprechende Originalarbeit mit dem Titel: *“A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study”* wurde am 25.04.2024 im Journal *Cancers* publiziert⁶.

Teilprojekt Grundlagenforschung

Es erfolgte die Präsentation vorläufiger Ergebnisse dieses Projektes als Special-e-Poster anlässlich des 19. Deutschen Wirbelsäulenkongresses in Hamburg 2024, mit dem Titel: *„Identifizierung neuer Immuncheckpoints im Immunmilieu maligner Knochenläsionen“*. Der Beitrag wurde mit dem 1. Posterpreis ausgezeichnet.

Ein entsprechendes Manuskript zur Untersuchung des Immunprofils von MSL und der Identifizierung neuer ICPs mit dem Titel: *„Identification of novel immune checkpoints relevant in bone metastasis-derived immune cells“* befindet sich gerade in der arbeitsgruppeninternen Revision und eine Einreichung ist für Beginn des Jahres 2025 beim Journal *Cancer Immunology, Immunotherapy* geplant.

Ein Manuskript zur Analyse der Koexpression von CD103 mit Erschöpfungsmarkern wie CD39, TIGIT, PVRIG und KIR2DL5A in MSL mit dem Titel *„Enrichment of Exhausted CD103⁺ CD4⁺ T Cells in Bone Metastases Compared to Non-Malignant Controls“* befindet sich gerade bei dem Journal *World Journal of Surgical Oncology* im Review.

Wir bitten darum den Inhalt dieses Abschlussberichtes vertraulich zu behandeln, da eine Publikation der bislang unveröffentlichten Daten aktuell aussteht. Wir danken der Deutschen Wirbelsäulenstiftung für die Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg des Projektes beigetragen hat.

Im Namen der Antragsteller,

Dr. L.-G. Leonhardt

Literatur:

1. Soeharno H, Povegliano L, Choong PF. Multimodal Treatment of Bone Metastasis-A Surgical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:518. doi:10.3389/fendo.2018.00518
2. Caldarella A, Crocetti E, Taddei GL, Paci E. Cytopathological diagnosis in a cancer registry: a useful diagnostic tool? *Cancer*. Apr 25 2007;111(2):99-105. doi:10.1002/cncr.22579
3. Varadhachary GR, Abbruzzese JL, Lenzi R. Diagnostic strategies for unknown primary cancer. *Cancer*. May 1 2004;100(9):1776-85. doi:10.1002/cncr.20202
4. Sailer V, Schiffman MH, Kossai M, et al. Bone biopsy protocol for advanced prostate cancer in the era of precision medicine. *Cancer*. Mar 1 2018;124(5):1008-1015. doi:10.1002/cncr.31173
5. Koepke LG, Heuer A, Stangenberg M, et al. Surgical Site Cytology to Diagnose Spinal Lesions. *Diagnostics (Basel)*. Jan 26 2022;12(2)doi:10.3390/diagnostics12020310
6. Leonhardt LG, Heuer A, Stangenberg M, et al. A Combined Cyto- and Histopathological Diagnostic Approach Reduces Time to Diagnosis and Time to Therapy in First Manifestation of Metastatic Spinal Disease: A Cohort Study. *Cancers (Basel)*. Apr 25 2024;16(9)doi:10.3390/cancers16091659
7. Hernandez RK, Wade SW, Reich A, Pirolli M, Liede A, Lyman GH. Incidence of bone metastases in patients with solid tumors: analysis of oncology electronic medical records in the United States. *BMC Cancer*. Jan 6 2018;18(1):44. doi:10.1186/s12885-017-3922-0
8. Keung EZ, Wargo JA. The Current Landscape of Immune Checkpoint Inhibition for Solid Malignancies. *Surg Oncol Clin N Am*. Jul 2019;28(3):369-386. doi:10.1016/j.soc.2019.02.008
9. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. Feb 9 2017;168(4):707-723. doi:10.1016/j.cell.2017.01.017
10. Chow A, Uddin FZ, Liu M, et al. The ectonucleotidase CD39 identifies tumor-reactive CD8(+) T cells predictive of immune checkpoint blockade efficacy in human lung cancer. *Immunity*. Jan 10 2023;56(1):93-106 e6. doi:10.1016/j.immuni.2022.12.001
11. Tang W, Chen J, Ji T, Cong X. TIGIT, a novel immune checkpoint therapy for melanoma. *Cell Death Dis*. Jul 26 2023;14(7):466. doi:10.1038/s41419-023-05961-3
12. Lu C, Liu Y, Ali NM, Zhang B, Cui X. The role of innate immune cells in the tumor microenvironment and research progress in anti-tumor therapy. *Front Immunol*. 2022;13:1039260. doi:10.3389/fimmu.2022.1039260
13. Hoffmann JC, Schon MP. Integrin alpha(E)(CD103)beta(7) in Epithelial Cancer. *Cancers (Basel)*. Dec 9 2021;13(24)doi:10.3390/cancers13246211