

Aus der

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

LMU Klinikum

Direktor: Prof. Dr. med. S. Mahner

Das Tumor Microenvironment beim Mammakarzinom

Eine Analyse zur prognostischen Bedeutung von Prostaglandinrezeptoren, Makrophagen und Lektinen

Habilitationsschrift

zum Erwerb der Venia Legendi

für das Fach

Frauenheilkunde und Geburtshilfe

vorgelegt von

Dr. med. Anna Hester, M.Sc.

2021

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort.....	3
2. Einleitung	4
2.1 Das Mammakarzinom	4
2.1.1 Klassifikation des Mammakarzinoms.....	4
2.1.2 Therapie des Mammakarzinoms	5
2.2 Das Tumor Microenvironment (TME)	6
2.2.1 Die COX-2-Signalkaskade bei Tumorerkrankungen	7
2.2.2 Rezeptoren der COX-2-Signalkaskade.....	8
2.2.3 Makrophagen im TME	10
2.2.4 Lektine als Mediatoren der Tumorzell-Immunzell-Interaktion.....	10
3. Zielsetzung.....	13
4. Eigene Ergebnisse	14
4.1 Analyse des Prostaglandinrezeptors EP3.....	14
4.1.1 EP3 beim Mammakarzinom	14
4.1.2 EP3 bei gynäkologischen Tumorentitäten	15
4.1.3 Analysen zu EP3 auf zellkultureller Ebene	18
4.1.4 Zusammenfassende Einordnung der Ergebnisse zum EP3-Rezeptor	20
4.2 Analyse ausgewählter Faktoren im TME des Mammakarzinoms	21
4.2.1 Makrophagen in Tumorstroma und tumor-umgebendem Fettgewebe	21
4.2.2 Galektine am Beispiel von Galektin-7 und Galektin-8	23
4.2.3 Siglecs am Beispiel von Siglec-8.....	25
5. Zusammenfassende Diskussion und Bedeutung für das Fachgebiet.....	27
6. Literatur.....	31
7. Abkürzungsverzeichnis.....	40
8. Danksagung.....	41
9. Anhang – Verzeichnis der habilitationsrelevanten Fachpublikationen.....	42

1. Vorwort

Diese kumulative Habilitationsschrift „Das Tumor Microenvironment beim Mammakarzinom – Eine Analyse zur prognostischen Bedeutung von Prostaglandinrezeptoren, Makrophagen und Lektinen“ legt Erkenntnisse zur Bedeutung prognostischer Faktoren im Tumorgewebe und der unmittelbaren Tumorumgebung (Tumor Microenvironment, TME) beim Mammakarzinom dar. Integrales Element der Untersuchungen ist die Analyse der Bedeutung des Prostaglandin E-Rezeptors (EP-Rezeptor{ XE "EP" \t "*Prostaglandin E-Rezeptor*" }) 3. Dieser ist Bestandteil der inflammatorischen Signalkaskade über Cyclooxygenase (COX{ XE "COX-2" \t "*Cyclooxygenase*" })-2 und Prostaglandin E2 (PGE2{ XE "PGE2" \t "*Prostaglandin E2*" }), die eine wesentliche Rolle in der chronischen Inflammationsreaktion im TME spielt. Außerdem werden am Beispiel von Makrophagen und ausgewählten Proteinen aus der Gruppe der Lektine weitere Strukturen des TME beleuchtet, die an der Tumorzell-Immunzell-Interaktion beteiligt sind und Wechselwirkungen zur chronischen Inflammationsreaktion zeigen. Diese Analysen sollen eine Grundlage zur Identifikation neuer Angriffspunkte in der Inflammationskaskade und in der Tumorzell-Immunzell-Interaktion für diagnostische und therapeutische Ansätze sein und den Ausgangspunkt für weiterer Untersuchungen darstellen.

Eine allgemeine Einführung legt Grundlagen zum Mammakarzinom und zur Bedeutung des TME und chronischer Inflammationsreaktionen für Tumorerkrankungen dar. Im Anschluss werden zunächst die Untersuchungsergebnisse zum EP3-Rezeptor beim Mammakarzinom beschrieben und mit gynäkologischen Tumorerkrankungen verglichen. Im Weiteren wird die Bedeutung von Makrophagen, Galektinen und Siglec-8 als mögliche assoziierte Faktoren im TME dargestellt. Abschließend folgt eine zusammenfassende Diskussion zur Bedeutung dieser Arbeit für das Fachgebiet, zu möglichen Limitationen sowie ein Ausblick auf potenzielle künftige Entwicklungen

Bezüglich genauer Angaben zur Methodik, detaillierten Ergebnissen sowie zur Diskussion der einzelnen Studien wird auf die entsprechenden Originalarbeiten verwiesen, welche an entsprechender Stelle zitiert werden und sich im Anhang dieser kumulativen Habilitationsschrift befinden.

2. Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist gemäß der weltweiten Krebsstatistik (GLOBOCAN [111]) der häufigste maligne Tumor und machte 11,7 % aller Krebsneuerkrankungen 2020 aus (bei Frauen 24,5 %). Im Jahr 2020 wurden etwa 2,3 Millionen Neuerkrankungen weltweit beschrieben; die Inzidenz steigt seit 1980 an. Bei Frauen stellte das Mammakarzinom 2020 auch die häufigste Krebstodesursache dar. [111]

2.1.1 Klassifikation des Mammakarzinoms

Die international gültige TNM-Klassifikation für Mammakarzinome folgt klinisch-pathologischen Kriterien [16]. In dieser Klassifikation spielen Faktoren wie Tumorgroße (T{ XE "T" \t "*Tumorgroße*" }), das Vorhandensein oder Fehlen regionärer Lymphknotenmetastasen (Nodus, N{ XE "N" \t "*Nodus, Lymphknoten*" }) sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Metastasen (M{ XE "M" \t "*Metastasen*" }) eine wichtige Rolle. Weitere Kriterien betreffen z. B. eine Invasion in Venen oder Lymphgefäße oder die Angabe, wie differenziert das Tumorgewebe ist (Grading, G{ XE "G" \t "*Grading*" }). Je nach Verteilung der TNM-Kriterien ergibt sich die Einteilung in die Stadien 0-IV mit prognostischer Assoziation. [16]

Biologisch gesehen ist das Mammakarzinom jedoch eine heterogene Erkrankung. Daher wird seit einiger Zeit versucht, die tumorbiologischen Eigenschaften des Mammakarzinoms genauer zu identifizieren, deren prognostische Relevanz zu analysieren und Therapiekonzepte daran auszurichten [40]: So sind die Hormonrezeptoren (HR{ XE "HR" \t "*Hormonrezeptor*" }) Östrogen- (ER{ XE "ER" \t "*Östrogenrezeptor*" }) und Progesteronrezeptor (PR{ XE "PR" \t "*Progesteronrezeptor*" }) schon lange als wichtige biologische Faktoren bekannt. Darüber hinaus wurde die Amplifikation eines epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors, des „human-epidermal growth factor receptor 2“ (HER2{ XE "HER2" \t "*human epidermal growth factor receptor 2*" }), bei etwa 13-15 % der Mammakarzinome beschrieben [40]. Initial wurde die Bedeutung dieser Faktoren in Hinblick auf ihre prognostische Relevanz identifiziert; im Laufe der Zeit gelang es, sie auch als therapeutische Zielstrukturen zu nutzen. Der Nachweis einer HER2-Amplifikation war z. B. mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert; durch die Implementierung spezifischer Anti-HER2-Therapien hat sich die Prognose dieser Patient*innen jedoch entscheidend verbessert [89]. Die beschriebenen Parameter werden für die Therapiefestlegung meist kategorisiert genutzt, so wird beispielweise von HER2-positiven oder -negativen und HR-positiven oder -negativen Tumoren gesprochen [40]. Durch Kombination dieser Faktoren ist demnach

eine biologische Klassifikation, z. B. in die Gruppe der HR-positiven/HER2-negativen Mammakarzinome oder in die HR-negativen/HER2-negativen Mammakarzinome (genannt triple-negatives Mammakarzinom, TNBC{ XE "TNBC" \t "*Triple-negatives Mammakarzinom*" }) möglich.

Basierend auf Genexpressionsanalysen mit einer Multigenexpression aus 50 Genen konnten bereits im Jahr 2000 verschiedene intrinsische biologische Subtypen (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Claudin-low, Basal-like) mit prognostischer Assoziation identifiziert werden [90]. Diese intrinsischen Subtypen zeigen eine hohe Überlappung mit den oben genannten Kategorien, die auf Grundlage immunhistochemisch bestimmbarer Marker definiert werden [40]. Daher wird im klinischen Alltag statt einer Einteilung nach aufwendiger Genexpressionsanalyse meist die immunhistochemisch-bestimmte Surrogatklassifikation verwendet, die sich in ihrer Namensgebung aber auf die genetisch determinierten Subtypen bezieht: 1) Luminal A-like Tumoren zeigen eine hohe HR-Expression, ein niedriges Grading, niedrige Proliferationsraten und eine gute Prognose. 2) Luminal B-like HER2-negative Tumoren zeigen eine niedrigere HR-Expression und ein schlechteres Grading als Luminal A-like Tumoren; die Prognose ist ebenfalls schlechter. Im klinischen Alltag kann die Unterscheidung zwischen Luminal A-like und Luminal B-like schwierig sein, so dass ggf. unterstützend Genexpressions-tests zur Abschätzung und damit Therapieentscheidung eingesetzt werden [2]. Die HER2-positiven Tumoren werden eingeteilt in 3) Luminal B-like HER2-positive Tumoren und 4) HER2-positive nicht-luminale Tumoren. Beide zeigen eine intermediäre Prognose. 5) Das TNBC (genetisch meist Claudin-low und Basal-like) weist weder eine HR-Expression noch eine HER2-Amplifikation auf und hat in der Regel die schlechteste Prognose [40].

2.1.2 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms ist stets multimodal [40]. Moderne Therapiekonzepte richten sich neben den klassischen Kriterien (TNM-Stadium) vor allem nach dem biologischen Subtyp, um spezifische Therapien zu ermöglichen und die biologische Heterogenität zu berücksichtigen. Beim primären, nicht-metastasierten Mammakarzinom stellt die lokoregionäre Therapie (operative Therapie und ggf. Strahlentherapie) eine wichtige Therapiesäule dar. Zudem wird in der Regel eine systemische Therapie appliziert. Diese kann je nach Tumorbilogie aus antihormoneller Therapie, Chemotherapie, Anti-HER2-Therapie oder ggf. auch neuen Therapiekonzepten bestehen. Das fortgeschrittene Mammakarzinom ist prinzipiell die Domäne der Systemtherapie, die grundsätzlich auf vergleichbaren Ansätzen basiert wie beim primären Mammakarzinom. Operative Therapien spielen hier eine

untergeordnete Rolle; die Strahlentherapie wird individuell (z. B. zur Schmerzlinderung und Stabilisierung bei Knochenmetastasen) eingesetzt. [40]

Generell hat die Identifikation spezifischer Marker und die darauffolgende Implementierung zielgerichteter Therapien zu einer deutlichen Individualisierung der Therapie des Mammakarzinoms geführt [40]. Spezifische biologische Marker können einerseits als Zielstrukturen für neue Medikamente dienen und so wirksame und potenziell nebenwirkungsarme Therapien ermöglichen. Andererseits können sie als prognostische Faktoren dienen, um Patient*innen mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung zu identifizieren, die dann intensivere Therapien erhalten können als Patient*innen mit günstigerem Profil der prognostischen Parameter [41].

Die aktuellen wissenschaftlichen Bestrebungen gehen nun noch über das Konzept zielgerichteter Therapien, die auf Strukturen der Tumorzelle selbst abzielen, hinaus und beziehen die unmittelbare Tumorumgebung, das TME { XE "TME" \t "*tumor microenvironment*" }, mit ein [40]. Das TME (detaillierter beschrieben unter 2.2) trägt wahrscheinlich wesentlich zur Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen bei [36, 93]. Eine chronische Inflammationsreaktion und Tumorzell-Immunzell-Interaktionen im TME spielen hier eine wichtige Rolle. Aktuelle Therapiekonzepte mit sogenannten Immuntherapien, also Medikamenten, die die Tumorzell-Immunzell-Interaktion beeinflussen, haben die Krebstherapie revolutioniert: Sie zeigen z. B. in Kombination mit Chemotherapien Wirksamkeit beim TNBC, welches aufgrund seiner fehlenden Zielstrukturen bislang nicht mit klassischen, zielgerichteten Therapien behandelbar war [29]. Untersuchungen zum TME, der Bedeutung inflammatorischer Reaktionen und der Tumorzell-Immunzell-Interaktion sind also von höchstem wissenschaftlichem Interesse.

2.2 Das Tumor Microenvironment (TME)

Die unmittelbare Tumorumgebung, das TME, ist für die Entstehung und Progression von Karzinomen von entscheidender Bedeutung [36, 93]. Das TME besteht aus Tumorzellen, der extrazellulären Matrix, löslichen Faktoren wie Zytokinen sowie umgebenden mesenchymalen Zellen und Immunzellen. Wesentliches Element des TME ist eine chronische Inflammationsreaktion, die die Tumorentstehung, aber auch auf das weitere Wachstum und die Metastasierung beeinflusst. Diese wird über eine COX-2/PGE2-Signalkaskade vermittelt. Ein wichtiger funktioneller Mechanismus ist wahrscheinlich, dass durch die chronische Inflammationsreaktion der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT { XE "EMT" \t "*epithelial-mesenchymale Transition*" }) der Tumorzellen begünstigt wird [84]. Die EMT

bezeichnet den Übergang der Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp, der für eine Zellmigration und -invasion und dadurch für eine Metastasierung nötig ist [36, 72]. Um eine Metastasierung zu ermöglichen, werden zudem pro-angiogene Faktoren im TME freigesetzt, die eine Gefäßeinsprossung bewirken [36]. Neben der chronischen Inflamationsreaktion spielen auch immunsuppressive Effekte im TME eine Rolle, vor allem im Prozess der Tumorprogression [93]. Tumorzellen müssen sich vor den Immunzellen im TME „verstecken“, um nicht abgetötet zu werden. Hierzu nutzen Tumorzellen zum Beispiel sogenannte Immuncheckpoints, mit denen normale Zellen dem Immunsystem signalisieren können, körpereigen und gesund zu sein, was autoimmune Reaktionen verhindert [60]. In der Immunevasion des Tumors spielt die EMT eine wichtige Rolle [106], durch sie kann es zur Expression von Immuncheckpoint bzw. deren Liganden auf Tumorzellen kommen, wodurch diese nicht mehr als „fremd“ erkannt werden [4, 27]. Das wohl bekannteste Beispiel ist der „programmed death protein/ligand-1“ (PD-1/PD-L1) Signalweg, ein Immuncheckpoint zwischen Tumorzellen und T-Zellen [15]. Die Entwicklung gezielter Blockademöglichkeiten dieses Signalwegs im Rahmen sogenannter Immuntherapien hat die Krebstherapie entscheidend beeinflusst [29]. Die überzeugenden Ergebnisse zu Immuntherapien stellten die Bedeutung des TME eindrücklich heraus. Daher finden aktuell intensive Untersuchungen zum TME statt, um weitere moderne Therapiekonzepte mit beispielsweise Hemmung der chronischen Inflamationsreaktion oder Beeinflussung der Immuncheckpoint-Signalwege zu entwickeln.

2.2.1 Die COX-2-Signalkaskade bei Tumorerkrankungen

Die COX-2 Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle in der chronischen Inflamationsreaktion im TME und wird im Folgenden kurz beschrieben [36, 43, 52]: COX-Enzyme sind Schlüsselenzyme in der Synthese von Eikosanoiden. Während COX-1 ubiquitär exprimiert wird, findet sich in den meisten menschlichen Geweben normalerweise keine COX-2 Expression. Eine COX-2 Expression kann z. B. im Rahmen der inflammatorischen Immunantwort durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden. Beide COX-Enzyme katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure in PGG₂ und weiter zu PGH₂, welches wiederum der Vorläufer für verschiedene Eikosanoide wie PGE₂, Prostazyklin oder Thromboxan A₂ ist. Eikosanoide sind Gewebshormone, die autokrin und parakrin wirken können und in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen: Das Gleichgewicht zwischen Thromboxan A₂ und Prostazyklin ist beispielsweise essenziell für die Hämostase, während PGE₂ das häufigste Prostaglandin bei Menschen und ein Schlüsselmediator der Inflammation ist. [43, 52]

Eine erhöhte Expression des Enzyms COX-2 sowie konsekutiv erhöhte Spiegel von PGE2 werden schon lange mit Karzinogenese und Tumorprogression assoziiert [43, 52, 118, 120]. Über 60 % der Mammakarzinome, aber auch prä maligne Läsionen wie das duktales in situ-Karzinom der Brust, weisen eine erhöhte COX-2-Expression auf, welche wiederum mit einem aggressiveren Phänotyp im Sinne eines höheren Gradings und einer höheren Proliferationsrate assoziiert ist [8, 43]. Auch bei weiteren gynäkologischen Tumorentitäten wie dem Ovarialkarzinom [95] und dem Zervixkarzinom [46] hat eine chronische Entzündungsreaktion Einfluss auf die Tumorgenese. Eine erhöhte COX-2-Expression in den Tumorzellen kann durch verschiedene Onkogene, Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren ausgelöst und zum Beispiel durch Makrophagen des TME induziert werden [36, 51]. COX-2 selbst kann wiederum die Polarisierung der Makrophagen beeinflussen [121]. Außerdem beschreiben verschiedene Arbeiten eine Ko-Lokalisation von COX-2 mit dem Immuncheckpoint-Liganden PD-L1, so dass eine Wechselwirkung zwischen chronischer Inflammation und Tumorzell-Immunzell-Interaktion wahrscheinlich scheint [30, 44, 51, 105].

Der therapeutische Ansatz, die COX-2-PGE2-Achse zu hemmen, zeigte in Studien bereits vielversprechende Ergebnisse: Der Einsatz selektiver COX-2-Inhibitoren, der Coxibe, führte – sowohl im Mausmodell als auch in einer Fall-Kontroll-Studie – zu einer geringeren Tumorprogression bzw. zu einem reduzierten Risiko, Brustkrebs zu entwickeln [42, 99]. Leider können Coxibe zu deutlichen kardiovaskulären Nebenwirkungen (z. B. Thrombosen und Embolien) führen, was deren therapeutische Verwendung einschränkt [11]. Das Nebenwirkungsprofil der Coxibe ist wahrscheinlich durch eine Dysbalance pro- und antiaggregatorischer Faktoren bedingt: Durch die selektive COX-2-Hemmung wird die Synthese des antiaggregatorischen Prostazyklins gehemmt, während die proaggregatorische Thromboxansynthese über COX-1 aufrecht erhalten bleibt [52]. Da die funktionelle Relevanz der COX-2-PGE2-Achse und generell der chronischen Inflammationsreaktion im TME jedoch unbestritten ist, wird nun nach weiteren, spezifischen, therapeutischen Angriffspunkten in der COX-2-Signalkaskade gesucht.

2.2.2 Rezeptoren der COX-2-Signalkaskade

COX-2 kann physiologische und pathologische Effekte über verschiedene Rezeptoren vermitteln: Es wurde beschrieben, dass COX-2 den Kernrezeptor „proliferator-activated receptor γ “ (PPAR- γ) reguliert [63]. Dieser Kernrezeptor, der als Transkriptionsfaktor wirkt, wird von verschiedenen Tumorentitäten inklusive des Mammakarzinoms exprimiert [6, 104]. Eine Aktivierung des Rezeptors über PPAR- γ -Liganden konnte *in vitro* und *in vivo* die

Tumorzellproliferation supprimieren, was für einen protektiven Einfluss des Rezeptors spricht [38]. Beim Mammakarzinom wurden jedoch auch tumorfördernde Wirkungen und ein negativer prognostischer Einfluss von PPAR- γ beschrieben [104]. Weitere Rezeptoren in der COX-2-Signalkaskade stellen die bislang weniger gut untersuchten, membranständigen, Guanosintriphosphat-bindendes-Protein (G-Protein{ XE "G-Protein" \t "*Guanosintriphosphat-bindendes Protein*" })-gekoppelten PGE2-Rezeptoren EP1-4 dar [109]: Die EP-Rezeptoren vermitteln die PGE2-Wirkung je nach Rezeptor über verschiedene nachgeschaltete Signalwege. Der EP2- und der EP4-Rezeptor aktivieren über ein stimulatorisches G-Protein (Gs-Protein{ XE "Gs-Protein" \t "*stimulatorisches G-Protein*" }) einen Proteinkinase A/Adenylatzyklase-vermittelten Signalweg und führen zu einem intrazellulären Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP{ XE "cAMP" \t "*zyklisches Adenosinmonophosphat*" }), während der EP1-Rezeptor an ein Phospholipase C (PLC{ XE "PLC" \t "*Phospholipase C*" })-gekoppeltes G-Protein (Gq-Protein{ XE "Gq-Protein" \t "*PLC-gekoppeltes G-Protein*" }) bindet und einen intrazellulären Kalziumanstieg bewirkt. Für den EP3-Rezeptor sind verschiedene Isoformen bekannt, die hauptsächlich über ein inhibitorisches G-Protein (Gi-Protein{ XE "Gi-Proteine" \t "*inhibitorisches G-Protein*" }) wirken. Die Signaltransduktion am Gi-Protein des EP3-Rezeptors kann zu einer Hemmung der Adenylatzyklase mit konsekutivem Absinken der cAMP-Konzentration führen. Außerdem kann eine Phosphorylierung von „Extracellular-signal regulated Kinasen“ (ERK) zu phosphoryliertem (p{ XE "p" \t "*phosphoryliert*" })-ERK über das Gi-Protein vermittelt werden. Neben der Vermittlung PGE2-induzierter Effekte direkt an der Tumorzelle sind auch Wechselwirkungen der EP-Rezeptoren mit anderen Signalkaskaden oder anderen Zellen im TME denkbar, wobei hierzu jedoch bislang keine Untersuchungen vorliegen. Verschiedene Arbeiten zeigen die prognostische und funktionelle Relevanz der EP-Rezeptoren bei Tumorerkrankungen im Allgemeinen (diskutiert z. B. in [125]) und auch beim Mammakarzinom [96], wobei der Einfluss von EP1-4 tumortyp-spezifisch zu sein scheint. Beim Mammakarzinom sind unter den EP-Rezeptoren EP2 und EP4 am besten untersucht: Eine erhöhte Expression dieser Rezeptoren wurde mit Metastasierung, Tumorzellproliferation und -invasion assoziiert [18, 74, 96]. Der EP1-Rezeptor förderte einerseits die Tumorentwicklung, konnte jedoch andererseits supprimierend auf die Metastasierung von Mammakarzinomzellen wirken [62, 73]. Möglicherweise ist der Einfluss des EP1-Rezeptors somit in Hinblick auf Primärtumor und Metastasierung unterschiedlich. Der EP3-Rezeptor ist beim Mammakarzinom und auch weiteren Tumorentitäten am wenigsten untersucht; sowohl pro- als auch anti-tumorigene Effekte wurden beschrieben [96, 124]. Die EP-Rezeptoren sind somit als Vermittler der Wirkung der COX-2/PGE2-Achse wichtige Zielstrukturen für eine mögliche Beeinflussung der Inflamationsreaktion im TME.

2.2.3 Makrophagen im TME

Wesentlicher zellulärer Bestandteil des TME sind neben Karzinom-assoziierten Fibroblasten auch Immunzellen wie Makrophagen [36]. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs { XE "TAM" \t "*Tumor-assoziierte Makrophagen*" }) entwickeln sich wahrscheinlich aus eingewanderten Monozyten, die durch inflammatorische, von Tumorzellen sezernierte Zytokine, angelockt werden [92]. Bei verschiedenen Tumorentitäten wie auch dem Mammakarzinom wurde eine Infiltration mit TAMs mit einer verschlechterten Prognose assoziiert [19, 76, 79]. TAMs können das Tumorwachstum stimulieren, die EMT fördern und somit zu Migration, Invasion und zur Metastasierung beitragen [92]. Dabei spielt jedoch die Polarisation der Makrophagen eine wichtige Rolle [19, 76, 107]. Initial wurden im Sinne einer dichotomen Einteilung eher anti-tumorigene M1- und eher pro-tumorigene M2-Makrophagen unterschieden, wobei heute bekannt ist, dass sich deren Funktionen in Hinblick auf Tumorförderung oder -suppression wahrscheinlich deutlich überlappen. Wie oben bereits erwähnt können M1-polarisierte TAMs beispielsweise eine COX-2 Überexpression induzieren und zur chronischen Inflammationsreaktion beitragen [51, 92]. Andererseits können TAMs durch COX-2 zum M2-Subtyp polarisiert werden [121]. Für die Tumorgenese und -progression haben wahrscheinlich diese M2-polarisierten TAMs eine größere Bedeutung: sie können die EMT begünstigen, aber auch selbst unmittelbar eine Immunsuppression vermitteln [36]. TAMs können dazu PD-L1 exprimieren und so die zytotoxische T-Zell-Antwort supprimieren [66]. Wechselwirkungen von TAMs mit der Tumorzell-Immunzell-Interaktion, aber auch mit der chronischen Inflammationsreaktion im TME, sind also evident.

TAMs können eine Rolle als Prognosefaktoren, aber auch als prädiktive Marker für das Ansprechen von Chemo-, antiangiogenen und Immuntherapien spielen [19, 76]. Aus therapeutischer Sicht werden verschiedene Strategien mit TAMs derzeit intensiv untersucht, die die Depletion von TAMs, die Modifizierung der Makrophagen-Rekrutierung und ein TAM-Reprogramming einschließen [92].

2.2.4 Lektine als Mediatoren der Tumorzell-Immunzell-Interaktion

Neben PD-(L)1 gibt es weitere Immuncheckpoint-Signalwege und Proteine, die zur Tumorzell-Immunzell-Interaktion beitragen, wobei eine Wechselwirkung zwischen diesen Signalwegen möglich ist [60, 128]. In dieser Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems spielen auch Proteine aus der Gruppe der Lektine eine Rolle, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden und deren funktionelle Bedeutung im Folgenden kurz beschrieben werden soll.

Zur Familie der Lektine gehören unter anderem die **Galektine** (Gal{ XE "Gal" \t "*Galektin*" }) [7]. Dies sind Proteine, die über spezifische, teils konservierte Kohlenhydrat-bindende Domänen (carbohydrate-recognition domain { XE "CRD" \t "*carbohydrate-recognition domain*" }, CRD) Galactosid-tragende Zucker binden können. Es werden drei verschiedene Subgruppen der Galektine unterschieden, die sich in ihrem strukturellen Aufbau in Hinblick auf Art und Anzahl der CRDs unterscheiden. Im Gegensatz zu den meisten Lektinen sind Galektine keine membrangebundenen, sondern lösliche Proteine, die sowohl intra- als auch extrazelluläre Aufgaben erfüllen können [117]. Verschiedene Galektine werden bei einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert, was häufig mit einer aggressiveren Tumorbilogie und vermehrter Metastasierung assoziiert wurde [64, 117]. Insbesondere für Gal-1, Gal-3 und Gal-7 sind pro-tumorigene Effekte beschrieben, wobei tumortyp-spezifische Unterschiede bestehen [24, 71, 101]. Der funktionelle Hintergrund des pro-tumorigenen Effekts beinhaltet unter anderem, dass Tumorzell-Galektine wie Gal-1, Gal-3 und Gal-9 Immunzellen im TME regulieren und supprimieren können [57, 58]. Gal-9 beispielsweise kann als Ligand mit den T-Zell-Immuncheckpoints PD-1 und „T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3“ (TIM3{ XE "TIM3" \t "*T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3*" }) interagieren, den Zelltod zytotoxischer T-Zellen induzieren und dadurch die anti-tumorigene Immunantwort reduzieren [37, 122]. Auch beim Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass der TIM3-Gal-9 Signalweg bedeutsam ist und Gal-9 Mammakarzinomzellen vor einem T-Zell-induziertem Zelltod schützen kann [123]. Galektine spielen somit funktionell als Liganden für Immuncheckpoints eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und könnten in Immuntherapien als Zielstruktur Verwendung finden.

Ebenfalls zur die Gruppe der Lektine gehören die **Sialinsäure-bindenden Lektine** (Siglec{ XE "Siglec" \t "*Sialinsäure-bindendes Lektin*" }) [116]. Siglecs können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die erste ist eine evolutionär hoch konservierte Gruppe, die Siglec-1, -2, -4 und -15 umfasst. Die übrigen Siglecs werden als Siglec-3 sowie Siglec-3-verwandte Siglecs zusammengefasst; dies stellt eine sich rasch entwickelnde Gruppe dar. Siglecs werden vor allem auf verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen). Sie sind an der Ligandenerkennung und -bindung, der Zell-Zell-Interaktion, aber auch am intrazellulären Signaling und der Regulation des Immunsystems beteiligt. In der Onkologie wurde bereits früh die Bedeutung von Siglecs für Leukämien und Lymphome beschrieben und therapeutisch implementiert [85]. Mit Gemtuzumab-Ozogamicin ist bereits ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, das den anti-Siglec-3 Antikörper Gemtuzumab enthält, für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie zugelassen. Auch anti-Siglec-2 Antikörper werden in klinischen Studien untersucht. Bei soliden Tumoren können Siglecs, die auf Immunzellen exprimiert werden, durch die Bindung an sialylierte Glykane auf den Tumorzellen als Immuncheckpoints fungieren [35]: Eine Sialylierung von Glykanen tritt als

Marker für körpereigene Zellen auf den meisten gesunden Zellen auf. Auf soliden Tumoren kann es zur Hypersialylierung kommen, die dann durch Siglec-Bindung zur Suppression anti-tumorigener Immunaktivität beiträgt. Somit stellen Siglecs auch bei soliden Tumoren wichtige potenzielle therapeutische Targets für Immuntherapien dar. Für den Einsatz verschiedener Siglec-spezifischer Antikörper, wie z. B. gegen Siglec-6, -7 und -9, liegen hier vielversprechende Ergebnisse zur Erhöhung der anti-tumorigenen Immunität vor [10, 55]. In der Literatur ist eine Expression von Siglecs nahezu ausschließlich durch Immunzellen beschrieben [116]. Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, dass auch Tumorzellen Siglecs exprimieren können [17, 87]. Die Datenlage zur Häufigkeit der Siglec-Expression auf Tumorzellen und deren funktioneller Bedeutung ist jedoch deutlich geringer.

3. Zielsetzung

Die Erkenntnisse über wesentliche biologische Eigenschaften des Mammakarzinoms haben in der Vergangenheit zu einer deutlichen Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten geführt, was die Prognose der Patient*innen kontinuierlich verbessert hat [40]. Dennoch verbleiben Patient*innen mit rasch progredientem Verlauf, die Rezidive oder Metastasierungen erleiden. Aktuelle therapeutische Konzepte beziehen Prozesse im TME mit ein. Im TME findet eine vielfältige Interaktion von Tumorzellen mit dem extrazellulären Stroma und mit umgebenden Zellen über komplexe Signalkaskaden statt; außerdem spielt eine chronische Inflammationsreaktion eine wichtige Rolle [36]. In diesen Prozessen können verschiedene prognostisch relevante Veränderungen vorliegen. Erkenntnisse über die Bedeutung dieser Strukturen könnten zur individuellen Prognoseabschätzung und Festlegung der Therapieintensität beitragen. Zudem ergeben sich an all diesen Stellen potenziell neue therapeutische Angriffspunkte.

Die im Rahmen dieser kumulativen Habilitationsarbeit erfolgten Untersuchungen sollten die Bedeutung der COX-2-Signalkaskade im TME und insbesondere des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom genauer beleuchten. Darüber hinaus sollten weitere Faktoren des inflammatorischen TME beim Mammakarzinom mit potenzieller Bedeutung in der Immunzell-Tumorzell-Interaktion, aber auch mit potenzieller Wechselwirkung zur EP3-Signalkaskade beleuchtet werden. Konkret wurden dabei folgende Fragestellungen betrachtet:

- Welche prognostische Relevanz zeigt der EP3-Rezeptor beim Mammakarzinom?
- Zeigen sich Ähnlichkeiten oder Unterschiede in der Bedeutung des EP3-Rezeptors zu gynäkologischen Tumoren und ergeben sich hieraus Hinweise auf mögliche assoziierte Faktoren?
- Lassen sich auf zellkultureller Ebene funktionelle Ursachen für beobachtete prognostische Assoziationen des EP3-Rezeptors detektieren?
- Welche prognostische Bedeutung haben Makrophagen des TME in Abhängigkeit von ihrer spezifischen Lokalisation beim Mammakarzinom und bestehen hier Assoziationen zum EP3-Rezeptor?
- Zeigen ausgewählte Proteine aus der Gruppe der Lektine beim Mammakarzinom prognostische Relevanz?

4. Eigene Ergebnisse

4.1 Analyse des Prostaglandinrezeptors EP3

4.1.1 EP3 beim Mammakarzinom

Semmlinger, A., von Schoenfeldt, V., Wolf, V., Meuter, A., Kolben, T. M., Kolben, T., Zeder-Goess, C., Weis, F., Gallwas, J., Wuerstlein, R., Hermelink, K., Schmoeckel, E., Harbeck, N., Mayr, D., Mahner, S., Jeschke, U., & Ditsch, N. (2018)

EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer

BMC cancer, 18(1), 431. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4286-9>

Die Relevanz der COX-2-PGE₂-Signalkaskade in Hinblick auf ihre Rolle im TME, ihre prognostische Bedeutung und potenzielle therapeutische Relevanz wurde bereits unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben. Für die signalvermittelnden Rezeptoren EP1-4 sind teils divergente Effekte für ihre Bedeutung in Entstehung und Progression des Mammakarzinoms beschrieben [96]. Während EP2 und EP4 besser untersucht sind, ist die Datenlage zu den Rezeptoren EP1 und EP3 geringer.

Im Rahmen dieses kumulativen Habilitationsprojekts wurde die prognostische Bedeutung des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom untersucht [103]. Dazu wurde die Expressionsstärke des EP3-Rezeptors auf Mammakarzinom-Tumorproben mit klinischen und pathologischen Parametern sowie retrospektiv mit dem klinischen Verlauf korreliert. Auf Tumorschnitten von 289 konsekutiven, sporadischen, primär nicht-metastasierten Mammakarzinom-Fällen wurde die EP3-Expression immunhistochemisch bestimmt und mittels des semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS{ XE "IRS" \t "*immunreaktiver Score*" }) ausgewertet. Es folgte eine Kategorisierung der Patientinnen in EP3-positive (EP3-IRS \geq 2) und EP3-negative Fälle (EP3-IRS < 2). [103]

Die EP3-Expression war nicht mit klinisch-pathologischen Parametern (wie z. B. Tumorgröße, Lymphknotenstatus, HR-Status, Alter) assoziiert. Nach einem Follow-Up von bis zu 10 Jahren zeigte sich, dass ein positiver EP3-Status mit einem signifikant verlängerten krankheitsfreien Überleben ($p = 0,002$) und Gesamtüberleben ($p = 0,01$) im Vergleich zum negativen EP3-Status assoziiert war. In einer multivariaten Analyse verblieb der EP3-Rezeptor auch unter Berücksichtigung weiterer prognostischer Faktoren als unabhängiger, signifikanter Faktor – sowohl für ein verlängertes krankheitsfreies Überleben (hazard ratio 1,81, $p = 0,003$), als auch für ein verlängertes Gesamtüberleben (hazard ratio 2,16, $p = 0,002$). [103]

Somit scheint eine hohe Expression des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom ein positiver prognostischer Parameter zu sein [103]. Ob er jedoch direkt z. B. antiproliferative Effekte an den Tumorzellen bewirkt, oder durch Interaktion mit umgebenden Strukturen das TME

beeinflusst, ist bislang nicht geklärt. Die Literatur zum EP3-Rezeptor beschreibt teils pro- teils anti-tumorigene Effekte bei Tumorerkrankungen im Allgemeinen [125]. Zur spezifischen Rolle von EP3 beim Mammakarzinom ist die Datenlage gering und beruht vor allem auf zellkulturellen Versuchen und Untersuchungen im Mausmodell [96]. Die vorliegende Arbeit ist die nach meinem Kenntnisstand größte Untersuchung an klinischen Mammakarzinomproben mit einem langen Follow-Up [103]. Hierin liegt auch die Stärke des untersuchten Kollektivs – die sehr lange Nachbeobachtungszeit. Andererseits sind dadurch die verwendeten Therapien nach dem heutigen Standard insbesondere in Hinblick auf zielgerichtete Therapien und Immuntherapien teilweise nicht mehr zeitgemäß. Deshalb ist für künftigen Untersuchungen die Aufstellung eines neuen, aktuellen Kollektivs zur Überprüfung der Effekte geplant. Selbstverständlich könnte durch den raschen Wandel in der Therapie des Mammakarzinoms auch ein solches, aktuelleres Kollektiv nach einer entsprechend langen Nachbeobachtungszeit in Hinblick auf die eingesetzten Therapien wieder veraltet sein, ist jedoch wichtig, um die beobachteten Effekte zu EP3 auch unter Berücksichtigung moderner, zielgerichteter Therapien beurteilen zu können.

4.1.2 EP3 bei gynäkologischen Tumorentitäten

Hester, A., Ritzer, M., Kuhn, C., Schmoeckel, E., Mayr, D., Kolben, T., Dannecker, C., Mahner, S., Jeschke, U., & Kolben, T. M. (2019)

The role of EP3-receptor expression in cervical dysplasia

Journal of cancer research and clinical oncology, 145(2), 313–319. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2785-3>

Czogalla, B., Kuhn, C., Heublein, S., Schmöckel, E., Mayr, D., Kolben, T., Trillsch, F., Burges, A., Mahner, S., Jeschke, U., & **Hester, A.** (2019)

EP3 receptor is a prognostic factor in TA-MUC1-negative ovarian cancer

Journal of cancer research and clinical oncology, 145(10), 2519–2527. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03017-8>

Nachdem die Datenlage zur Bedeutung des EP3-Rezeptors bei Tumorerkrankungen uneinheitlich ist, die eigene Arbeit zum Mammakarzinom jedoch eindeutig eine positive prognostische Relevanz gezeigt hatte [103], wurden vergleichende Analysen zur Bedeutung des EP3-Rezeptors bei gynäkologischen Tumoren durchgeführt.

Durch die Arbeitsgruppe der Frauenklinik am LMU Klinikum konnte bereits gezeigt werden, dass beim **Endometriumkarzinom** – im Gegensatz zum Mammakarzinom – eine starke Expression des EP3-Rezeptors mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert war [129]. Zellkulturelle Untersuchungen konnten in dieser Studie bestätigen, dass bei Blockade des EP3-Rezeptors wiederum pro-tumorigene Eigenschaften von Endometriumkarzinom-Zellen

(z. B. eine hohe Proliferation, Migration etc.) reduziert waren. Eine entsprechende Datenlage zu einem negativem Einfluss der COX-2-PGE2-Achse besteht beim Endometriumkarzinom auch in Hinblick auf die Überexpression von COX-2, erhöhte PGE2-Spiegel sowie für eine erhöhte Expression von EP2 und EP4 [125].

Beim **Zervixkarzinom** ist der EP3-Rezeptor auf niedrigem Niveau exprimiert, hat jedoch wie beim Endometriumkarzinom eine negative prognostische Relevanz [45, 124]. Zur Prüfung funktioneller Aspekte solch prognostischer Faktoren kann die Analyse der Bedeutung in Tumorstufen bedeutsam sein, wie dies bereits für COX-2 beschrieben wurde [8, 100]. Für das Zervixkarzinom sind als Tumorstufen die zervikalen Dysplasien (zervikale intraepitheliale Neoplasie, CIN{ XE "CIN" \t "zervikale intraepitheliale Neoplasie" }) beschrieben [67]. Um somit funktionelle Aspekte zu EP3 insbesondere auch in Hinblick auf einen möglichen Unterschied zum Mammakarzinom zu beleuchten, wurde im Rahmen dieser Habilitationsarbeit die Bedeutung des EP3-Rezeptors bei zervikalen Dysplasien untersucht.

Die immunhistochemische EP3-Analyse wurde auf 124 Proben von Patientinnen mit CIN1-3 bzw. gesunden Kontrollen durchgeführt und semiquantitativ mittels IRS ausgewertet. Zu den Fällen mit CIN2 wurde darüber hinaus betrachtet, ob es im Verlauf zu einem Progress zu einer CIN3 oder einer Regression (zu CIN1/keiner Dysplasie) kam. [47]

Die stärkste EP3-Expression zeigte sich bei gesundem Zervixgewebe (medianer IRS 12), während die Expression mit zunehmendem Grad der Dysplasie kontinuierlich abnahm (medianer IRS bei CIN1: 9, bei CIN2: 6, bei CIN3: 4) [47]. Bei CIN2-Läsionen, bei denen es im Verlauf zum Progress kam, war die EP3-Expression signifikant niedriger als bei regredientem Verlauf ($p = 0,04$). Interessanterweise war für den Verlauf der CIN2 somit eine hohe EP3-Expression ein günstiger prognostischer Faktor – im Gegensatz zur negativen prognostischen Bedeutung beim Zervixkarzinom [45, 47]. Dies zeigt, dass der EP3-Rezeptor bereits in der Entstehung einer Tumorerkrankung, eine Rolle spielen kann, sich funktionelle Aspekte jedoch in Hinblick auf Tumorentstehung und Tumorprogression ggf. unterscheiden können. Demnach muss genau unterschieden werden, für welche spezifischen Konstellationen prognostische Assoziationen beschrieben werden. Ein ähnlicher Unterschied in Hinblick auf Tumorentstehung und Metastasierung wurde für die prognostische Bedeutung des EP1-Rezeptors beim Mammakarzinom beschrieben [62, 73].

Bei **Ovarialkarzinomen** wurde ebenfalls ein negativer Einfluss hoher COX-2-Spiegel beschrieben [3, 95]. Während zu EP2 und EP4 beim Ovarialkarzinom Hinweise auf einen pro-tumorigenen Effekt vorliegen, war die Bedeutung des EP3-Rezeptors bislang unklar [108, 125]. Um die Bedeutung des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom suffizient mit den

gynäkologischen Tumoren vergleichen zu können, wurde im Rahmen dieser Habilitationsarbeit dessen Bedeutung auch beim Ovarialkarzinom untersucht.

Es erfolgte die immunhistochemische Expressionsanalyse des EP3-Rezeptors auf 156 konsekutiven Ovarialkarzinomfällen [22]. Die EP3-Expressionsstärke wurde mittels IRS semiquantitativ bestimmt. Neben der Analyse der absoluten EP3-Expressionsstärke erfolgte eine Kategorisierung in EP3-positive ($EP3\text{-IRS} \geq 2$) und -negative ($EP3\text{-IRS} < 2$) Tumoren zum Vergleich mit klinisch-pathologischen Parametern und an diesem Kollektiv in vorigen Studien bestimmten putativen prognostischen Faktoren. [22]

In der Analyse zeigte sich eine signifikant höhere EP3-Expression bei klarzelliger Histologie im Vergleich zu den anderen histologischen Subtypen ($p < 0,001$) [22]. Zu weiteren klinisch-pathologischen Parametern (wie klinischem Stadium, Alter, Lymphknotenstatus) zeigte sich keine signifikante Korrelation. Allerdings korrelierte die EP3-Expression signifikant mit der Gal-1-Expression und mit der Expression des tumor-assoziierten Epitops von Mucin 1 (TA-MUC1) { XE "TA-MUC1" \t "*tumor-assoziiertes Mucin 1*" }. Diese Faktoren wurden in Hinblick auf ihre prognostische Relevanz beim Ovarialkarzinom bereits beschrieben [25, 50, 102, 110]. In der TA-MUC1-negativen Subgruppe zeigte sich in der aktuellen Arbeit nun ein kürzeres Gesamtüberleben beim positivem EP3-Rezeptorstatus im Vergleich zum negativen EP3-Rezeptorstatus ($p = 0,035$), während in der TA-MUC1-positiven Subkohorte das Überleben nicht mit dem EP3-Rezeptorstatus assoziiert war [22]. Auch in der Gesamtkohorte sowie bei Subkategorisierung bezüglich Gal-1 Expression zeigte sich keine Assoziation des EP3-Rezeptorstatus zum klinischen Outcome

Somit stellt der EP3-Rezeptor auch beim Ovarialkarzinom einen negativen prognostischen Faktor dar, allerdings nur in der TA-MUC1-negativen Subgruppe [22]. Mucin-1 (MUC1 { XE "MUC1" \t "*Mucin-1*" }, besser bekannt als „Cancer Antigen“ (CA { XE "CA" \t "*Cancer Antigen*" }) 15-3, ist einer der am besten validierten Tumormarker des Mammakarzinoms [28]. Es ist ein Glykoprotein, das in verschiedenen epithelialen Zellen sowohl zytoplasmatisch als auch membranös vorkommt [25, 34]. Sein tumorspezifisches Epitop TA-MUC1 wird bei verschiedenen Tumorentitäten meist zytoplasmatisch exprimiert und wurde häufig mit einer ungünstigen Prognose assoziiert, so auch beim Ovarialkarzinom [75, 115, 126]. Beim Mammakarzinom konnte eine zytoplasmatische TA-MUC1 Expression hingegen nicht mit dem Überleben assoziiert werden, eine membranöse TA-MUC1 Expression war jedoch ein positiver prognostischer Faktor [49]. Somit zeigen sich für TA-MUC1 ähnlich wie für EP3 prognostisch relevante Unterschiede zwischen dem Mammakarzinom und dem Ovarialkarzinom. Die aktuelle Datenlage weist zudem auf eine Interaktion des MUC1-Signalwegs mit dem COX-2-PGE2-Signalweg hin [83]: Zytoplasmatisches MUC1 konnte beim Pankreaskarzinom durch Ko-Lokalisation mit dem Transkriptionsfaktor „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of

activated B-cells“ (NFkB{ XE "NFkB" \t "*nuclear factor \kappa-light-chain-enhancer*" of *activated B-cells*" }) zu einer Translokation dessen zum Kern und konsekutiv zu einer Bindung an den COX-2-Promotor führen. Dies bewirkte in dieser Arbeit eine Assoziation einer hohen MUC1-Expression mit hohen COX-2- Spiegeln, die durch einen MUC1-Knockdown reduziert werden konnten. MUC1-positive Pankreaskarzinome zeigten zudem eine Resistenz gegenüber dem COX-2-Inhibitor Celecoxib, während Celecoxib bei MUC1-negativen Karzinomen die Tumorprogression reduzieren konnte [78]. Dies weist darauf hin, dass MUC1 den COX-2-Signalweg aktivieren kann und dieser somit bei MUC1-positiven Tumoren konstitutiv überaktiviert sein könnte. Die durch die Überaktivierung ggf. hohen endogenen PGE2-Spiegel könnten zu einer deutlichen Aktivierung des EP3-Signalwegs führen – unabhängig von der EP3-Expressionsstärke. Bei MUC1-negativen Tumoren mit geringerer endogener PGE2-Produktion könnte die EP3-Expressionsstärke bedeutsamer für das Ausmaß der Aktivierung des EP3-Signalwegs sein. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb EP3 in der aktuellen Untersuchung nur bei TA-MUC1-negativen Tumoren eine Assoziation zum Outcome zeigte [22]. Weitere funktionelle Untersuchungen müssen allerdings diese Hypothese prüfen. Letztlich zeigen diese Ergebnisse aber auch, welche vielfältigen möglichen Wechselwirkungen des EP3-Rezeptors bestehen, die in weiterführenden Untersuchungen zum Mammakarzinom berücksichtigt werden sollten.

4.1.3 Analysen zu EP3 auf zellkultureller Ebene

Hester, A.*, Salzmann, B.*, Rahmeh, M., Kolben, T., Czogalla, B., Ditsch, N., Mahner, S., Jeschke, U., & Kolben, T. M. (2019). * geteilte Erstautorenschaft

EP3 receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells.

OncoTargets and therapy, 12, 6053–6068. <https://doi.org/10.2147/OTT.S204919>

Um mögliche Ursachen des Unterschieds zwischen dem Mammakarzinom und gynäkologischen Tumorentitäten herauszuarbeiten, wurden funktionelle, zellkulturelle Untersuchungen zum Mammakarzinom durchgeführt. Hierzu wurden zunächst verschiedene Zelllinien bezüglich ihrer EP3-Expression gescreent. Die Mammakarzinomzelllinie SK-BR3 (HER2-positiv, HR-negativ [33]) { XE "SK-BR3" \t "*HER2-positive Mammakarzinomzelllinie*" } zeigte basal eine niedrige EP3-Expression (48,7 %), die Zelllinie T-47D{ XE "T-47D" \t "*Luminal A-like Mammakarzinom-Zelllinie*" } (Luminal A-like Modell [127]) eine hohe (77,7 %) EP3-Expression [48]. Diese Zelllinien wurden daher als Modellsystem für Tumoren mit hoher und niedriger EP3-Expression ausgewählt und mit je drei verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 1000 nM) von PGE2, dem selektiven EP3-Antagonisten L798,106{ XE "L798,106" \t "*selektiver EP3-Antagonist*" }, dem EP1/EP3-Agonisten Sulproston (da ein selektiver EP3-

Agonist nicht verfügbar war) sowie einer Kombination aus Agonisten und Antagonisten behandelt. Bei T-47D-Zellen traten keine konstanten funktionellen Effekte durch die Inkubation mit sowohl dem Agonisten als auch dem Antagonisten auf. Bei SK-BR3-Zellen reduzierten sowohl der Agonist Sulproston als auch der Antagonist L798,106 die Proliferationsrate auf etwa 90 % und die Migrationsrate auf etwa 40-50 % (je nach eingesetzter Konzentration). In Hinblick auf die nachgeschaltete Signalkaskade führte die Inkubation mit dem EP3-Antagonisten zu einer signifikant reduzierten Gi-Protein-Expression (auf 70-80 %) und erhöhten cAMP-Spiegeln (auf ca. 110 %) sowie zu einer erhöhten Expression von p-ERK{ XE "ERK" \t "extracellular-signal Regulated Kinase" }, auf ca. 130 %). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei Mammakarzinomzellen über den EP3-Rezeptor Tumorzellproliferation und -migration stimuliert werden. Aufgrund der beobachteten Veränderungen in den Konzentrationen nachgeschalteter Proteine scheint dieser Effekt am ehesten durch einen Gi-Protein-gekoppelten Signalweg vermittelt zu sein. Die unter Sulproston-Einfluss beobachteten Effekte müssen mit Einschränkung gewertet werden, da Sulproston ebenfalls einen Agonismus am EP1-Rezeptor bewirken kann [1]. Die im Rahmen dieser Arbeit unter Sulproston beobachteten Effekte sind möglicherweise im Wesentlichen EP1 vermittelt. Den postulierten Signalweg für die beobachteten Effekte zeigt Abbildung 1 aus [48].

Platzhalter für Abbildung 1, einsehbar unter Hester, A.*, Salzmann, B.*, Rahmeh, M., Kolben, T., Czogalla, B., Ditsch, N., Mahner, S., Jeschke, U., & Kolben, T. M. (2019). * geteilte Erstautorenschaft
EP3 receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells.
OncoTargets and therapy, 12, 6053–6068.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S204919>
Aus urheberrechtlichen Gründen nicht in dieser elektronischen Publikation enthalten.

Abbildung 1: postulierter EP3-vermittelter Signalweg und beobachtete funktionelle Aspekte beim Mammakarzinom

Die zellkulturellen Ergebnisse weisen darauf hin, dass der EP3-Rezeptor an ein Gi-Protein koppelt, welches über cAMP und pERK zur Beeinflussung der Proliferation und Migration führt. Sulproston scheint im Wesentlichen über den EP1-Rezeptor zu wirken, der an ein Gq-Protein koppelt und hierüber vergleichbare funktionelle Effekten bewirkt. Bislang nicht eingeführte Abkürzungen in der Abbildung: Diacylglycerin (DAG), Inositoltriphosphat (IP3), Proteinkinase C (PKC), Ca²⁺ (Kalzium). Aus [48]

Die Einordnung der zellkulturellen Ergebnisse ist durch die heterogene Datenlage erschwert. Beispielsweise beim Plattenepithelkarzinom der Haut, beim Lungenkarzinom aber auch beim Endometriumkarzinom führte auf zellkultureller Ebene ein EP3-Antagonismus ebenfalls zu reduzierten Proliferations- und Migrationsraten [5, 69, 129]. Allerdings wurde beim Endometriumkarzinom – im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit beim Mammakarzinom [103] – ein negativer Effekt einer hohen EP3-Expression auch klinisch gezeigt [129]. Andere

Arbeiten geben wiederum auch im zellkulturellen Modell Hinweise auf einen protektiven Effekt des EP3-Rezeptors: Beim Prostatakarzinom führte ein EP3-Antagonismus zu einer verstärkten Tumorzellproliferation, während eine Überexpression von EP3 die Proliferation verringerte [53, 61]. Bei inflammatorischen Mammakarzinomzellen konnte ein EP3-Agonismus die Fähigkeit der Zellen zur vaskulogenen Mimikry, einem Charakteristikum aggressiver Tumoren, verringern [98].

4.1.4 Zusammenfassende Einordnung der Ergebnisse zum EP3-Rezeptor

Insgesamt zeigen die Versuche im Rahmen dieser Arbeit detailliert die Bedeutung des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom im Vergleich zu gynäkologischen Tumoren [22, 47, 48, 103]. In Hinblick auf die klinische Assoziation ergaben sich Hinweise auf eine positive prognostische Bedeutung des Rezeptors beim Mammakarzinom [103]. Im Gegensatz dazu war bei gynäkologischen Tumorentitäten und deren Vorstufen eine hohe EP3-Expression mit einem negativen klinischen Verlauf assoziiert [22, 47]. Die ergänzenden zellkulturellen Versuche beim Mammakarzinom zeigten, dass der prognostisch günstige Einfluss des EP3-Rezeptors möglicherweise nicht durch direkte Wirkung an den Tumorzellen verursacht wird, da hier EP3-vermittelte pro-tumorigene Effekte auftraten [48]. Beim Mammakarzinom könnten somit weitere Faktoren im TME mit dem EP3-Rezeptor wechselwirken, die diesen günstigen Effekt vermitteln. Hier ergaben sich im Rahmen der Arbeiten und anhand der Datenlage Hinweise auf Wechselwirkungen mit z. B. TA-MUC1 oder Galektinen [22, 26, 83]. Darüber hinaus können beispielsweise Interaktionen der COX-2-Achse [105] und dadurch von EP3 mit Immunzellen des TME eine Rolle spielen, wobei es zu dieser spezifischen Hypothese bislang keine Untersuchungen gibt. Zellkulturelle Versuche stellen andererseits auch immer nur ein Modell da, das die Realität nur begrenzt abbilden kann [14]. Somit kann sich der tatsächliche in vivo Effekt auch von den Ergebnissen der Zellkultur unterscheiden.

4.2 Analyse ausgewählter Faktoren im TME des Mammakarzinoms

Im zweiten Teil dieser Habilitationsarbeit sollten nun weitere umgebende Faktoren des TME beim Mammakarzinom, die möglicherweise mit der chronischen Inflammationsreaktion und dem EP3-Rezeptor interagieren, untersucht werden. Aufgrund der postulierten Hypothese, dass der positiv prognostische Effekt von EP3 möglicherweise durch Interaktion mit der Immunumgebung bedingt sein könnte, wurden Makrophagen für die weitere Analyse ausgewählt, da für diese Wechselwirkungen mit COX-2 beschrieben sind [51]. Darüber hinaus wurden verschiedene Proteine aus der Gruppe der Lektine ausgewählt, die generell zahlreiche Funktionen haben, aber insbesondere auch in der Tumorzell-Immunzell-Interaktion eine Rolle spielen [35, 57]. Auf die prognostische Bedeutung dieser Faktoren wird im Folgenden eingegangen.

4.2.1 Makrophagen in Tumorstroma und tumor-umgebendem Fettgewebe

Lin, L., Kuhn, C., Ditsch, N., Kolben, T., Czogalla, B., Beyer, S., Trillsch, F., Schmoeckel, E., Mayr, D., Mahner, S., Jeschke, U., & Hester, A. (2021)

Breast adipose tissue macrophages (BATMs) have a stronger correlation with breast cancer survival than breast tumor stroma macrophages (BTSMs)

Breast cancer research: BCR, 23(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01422-x>

Die Bedeutung von TAMs für die Pathogenese und Prognose des Mammakarzinoms wurde unter 2.2.3 beschrieben. Mammakarzinome werden unmittelbar von normalem Brustdrüsen-gewebe und Fettgewebe umgeben, das ebenfalls für Tumorgenese und Progression bedeutsam ist [31]. Es konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinomzellen mit umgebenden Adipozyten interagieren und sie sich gegenseitig in Hinblick auf die phänotypische Ausprägung und biologische Charakteristika beeinflussen können [112]. Im tumor-umgebenden Fettgewebe kommen ebenfalls Makrophagen vor: Es sind dort proinflammatorischen Prozesse in Form sogenannter „crown-like structures“ (CLS{ XE "CLS" \t "crown-like structures" }) beschrieben [31]. CLS bestehen aus nekrotischen Adipozyten und Makrophagen; ihr Vorkommen wurde mit einem schlechteren Outcome des Mammakarzinoms assoziiert.

In dieser Habilitationsarbeit wurde nun die Bedeutung von Makrophagen beim Mammakarzinom analysiert; dabei wurde sowohl die Bedeutung der Makrophagen im Tumorstroma (breast tumor stroma macrophages, BTSM{ XE "BTSM" \t "breast tumor stroma macrophages, Makrophagen im Tumorstroma" }s) als auch im Tumor-umgebenden Fettgewebe (breast adipose tissue macrophages, BATM{ XE "BATM" \t "breast adipose tissue macrophages, Makrophagen im tumor-umgebenden Fettgewebe" }s) untersucht [70]. Auf 298 Mammakarzinom-Proben wurden Makrophagen durch CD68-Färbung immunhistochemisch

identifiziert und quantifiziert. Für die Assoziation mit klinischen und pathologischen Parametern und dem klinischen Verlauf wurde sowohl die absolute Anzahl an BTSMs/BATMs als kontinuierliche Variable verwendet, als auch eine kategorisierte Variable mit jeweils zwei Subgruppen mit hohem bzw. niedrigem BTSMs bzw. BATMs Anteil (BTSMs/BATMs hoch/niedrig). [70]

Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen dem Vorkommen von BTSMs und BATMs (Korrelationskoeffizient [cc{ XE "cc" \t "Korrelationskoeffizient" }] = 0,5, $p < 0,001$). Eine hohe Anzahl an BTSMs lag vor allem beim TNBC ($p < 0,001$ im Vergleich zu den anderen Subtypen) vor; alle TNBC-Fälle waren der Subgruppe „BTSMs hoch“ zuzuordnen. Eine erhöhte Anzahl an BTSMs zeigten sich auch bei Tumoren mit hoher ki67-Expression ($p = 0,001$). Weitere Korrelationen zwischen BTSMs und klassischen klinisch-pathologischen Faktoren lagen nicht vor. Analog zu publizierten Vorarbeiten zu TAMs war ein gehäuftes Vorkommen von BTSMs mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ($p = 0,021$). [70]

Im Gegensatz zu BTSMs bestand bezüglich der Anzahl an BATMs keinerlei Assoziation zu klassischen klinischen und pathologischen Faktoren (wie Alter, Tumorgöße, biologischer Subtyp etc.). In der Subgruppe „BATMs hoch“ war jedoch (ebenso wie bei „BTSMs hoch“) das Gesamtüberleben signifikant kürzer als in der Subgruppe „BATMs niedrig“ ($p < 0,001$). Zudem zeigte sich eine Assoziation einer hohen Anzahl an BATMs mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben ($p = 0,03$). In einer Multivarianzanalyse, die neben bekannten prognostischen Faktoren sowohl BTSMs als auch BATMs einschloss, verblieben von den beiden untersuchten Makrophagenpopulationen lediglich BATMs als signifikanter Faktor (hazard ratio 3,24, $p = 0,005$). Interessanterweise bestand eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der BATMs und der EP3-Expression (cc = -0,198, $p = 0,003$). Das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen Subgruppen, die durch eine hohe bzw. niedrige EP3-Expression und einen hohen bzw. niedrigen BATMs-Anteil definiert wurden: Während Patientinnen mit wenigen BATMs und hoher EP3-Expression die beste Prognose zeigten, war diese bei Patientinnen mit hohen BATMs und niedriger EP3-Expression am schlechtesten ($p < 0,001$). Bei Kategorisierung nach EP3-Expression zeigte sich, dass in der EP3-positiven Subgruppe die Anzahl an BATMs nicht mit dem Überleben assoziiert war. Lediglich in der EP3-negativen Subgruppe war – ebenso wie in der Gesamtkohorte – ein hoher Anteil an BATMs mit einem kürzeren Gesamtüberleben ($p = 0,01$) und progressionsfreien Überleben ($p = 0,028$) assoziiert. [70]

Somit scheint bei positivem EP3-Rezeptorstatus die BATM-Population eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die beobachtete negative prognostische Bedeutung dieser Makrophagen in dieser Subgruppe nicht nachweisbar war. Möglicherweise kann der EP3-Rezeptor somit

BATMs beim Mammakarzinom regulieren. Dies könnte ein Mechanismus sein, der erklärt, weshalb eine hohe Expression des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom in der retrospektiven Analyse mit einem verbesserten Überleben assoziiert war [103]. Es ist bekannt, dass die COX-2-Achse zur Polarisierung der Makrophagen beiträgt und dies durch Coxibe beeinflusst werden kann [121]. In dieser Arbeit wurden die vermittelnden PGE2-Rezeptoren für diesen Effekt jedoch nicht untersucht. Kürzlich konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass EP3 eine Interleukin (IL{ XE "IL" \t "Interleukin" })-13 vermittelte Polarisierung von Makrophagen von einem pro-inflammatorischen zu einem reparierenden Phänotyp in der Leber induzieren konnte [82]. Ähnliche EP3-vermittelte Einflüsse auf die Polarisierung von BATMs könnte beim Mammakarzinom existieren.

4.2.2 Galektine am Beispiel von Galektin-7 und Galektin-8

Trebo, A., Ditsch, N., Kuhn, C., Heidegger, H. H., Zeder-Goess, C., Kolben, T., Czogalla, B., Schmoeckel, E., Mahner, S., Jeschke, U., & Hester, A. (2020)

High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients

Cancers, 12(4), 953. <https://doi.org/10.3390/cancers12040953>

Die Bedeutung von Galektinen bei Tumorerkrankungen wird wie unter 2.2.4 beschrieben insbesondere in Hinblick auf deren Rolle in Immuncheckpoint-Signalkaskaden untersucht [57, 88, 101, 102]. Wechselwirkungen zur COX-2-Signalkaskade scheinen möglich, da einzelne Galektine durch COX-2 induziert wurden, COX-2 induzieren konnten oder nur in Abhängigkeit einer EP-Rezeptor-Expression prognostische Relevanz zeigten [20, 26, 68]. Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit wurde aus der Gruppe der Galektine die prognostische Bedeutung von Gal-7 und Gal-8 beim Mammakarzinom überprüft. Gal-7 schien im Mausmodell insbesondere für das HER2-positive Mammakarzinom einen tumor-fördernden Effekt zu haben und zu einer vermehrten Metastasierung zu führen [24, 39]. Für Gal-8 ist die Datenlage deutlich geringer; es gibt lediglich vereinzelt Hinweise auf einen protektiven Effekt, da z. B. ein Silencing von Gal-8 zu einem verminderten Tumorwachstum von TNBC im Mausmodell führte [32]. Mit Gal-7 und Gal-8 wurden somit ein anhand der Datenlage eher pro- und ein eher anti-tumorigenes Galektin für die Untersuchungen ausgewählt.

Die immunhistochemische Analyse von Gal-7 und Gal-8 wurde an 235 konsekutiven Mammakarzinomfällen durchgeführt und mittels IRS semiquantitativ bewertet [114]. Je nach Expressionsstärke erfolgte eine dichotome Kategorisierung in Gal-7/Gal-8 hoch/niedrig-exprimierende Tumoren, welche dann in Hinblick auf ihre Assoziation zu klinisch-pathologischen Parametern und dem klinischen Verlauf untersucht wurden. [114]

Die Gal-7 Expression war signifikant höher bei höherem Grading ($p < 0,001$), negativem PR-Status ($p = 0,04$) und positivem HER2-Status ($p = 0,004$); es bestand also tendenziell eine Assoziation von Gal-7 mit aggressiveren tumorbiologischen Charakteristika. Von den verschiedenen biologischen Subtypen zeigten HER2-positive Mammakarzinome (sowohl Luminal-like als auch nicht-Luminal) die stärkste Gal-7-Expression. Eine hohe Gal-7-Expression war mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert und zeigte sich auch in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor (hazard ratio { XE "HR" \t "hazard ratio" } 2,24, $p = 0,049$). In der Subgruppenanalyse zeigte sich, dass eine hohe Gal-7-Expression neben der Gesamtkohorte auch in der HER2-positiven Subgruppe mit dem Outcome assoziiert war, nicht aber in der HER2-negativen Subgruppe. Gal-7 wurde auch von tumor-umgebenden Makrophagen exprimiert. Für Gal-8 zeigte sich ein Trend zu einer niedrigeren Expression mit zunehmendem Grading ($p = 0,08$) und eine signifikant höhere Expression bei positivem ER-Status ($p = 0,026$), also tendenziell eine Assoziation der Gal-8 Expression zu einer günstigeren Tumorbiologie. Eine hohe Gal-8 Expression war mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert ($p = 0,032$), wobei in der multivariaten Analyse Gal-8 nicht als signifikanter Faktor verblieb. [114]

Gal-7 und Gal-8 zeigten somit gegenläufige prognostische Assoziationen beim Mammakarzinom [114]. Durch die Kombination der Gal-7 mit der Gal-8-Expression konnte eine Subgruppe identifiziert werden (hohe Gal-7 und niedrige Gal-8 Expression), die einen besonders ungünstigen Verlauf zeigte (6,8 % aller Patientinnen). Dies bestätigt die Möglichkeit der künftigen Nutzung von Parametern wie Galektinen als prognostische Marker. Insbesondere beim HER2-positiven Mammakarzinom könnte Gal-7 eine relevante Rolle spielen. Außerdem scheint eine Wechselwirkung zur COX-2-Achse möglich. Für TAMs sind eindeutige Interaktionen mit der COX-2-Achse beschrieben [51, 121]; TAMs zeigten in der vorliegenden Arbeit nun wiederum eine Expression von Gal-7 [114]. Dies ist ein möglicher Hinweis auf eine potenzielle Bedeutung von Gal-7 in der chronischen Inflammationsreaktion, aber ggf. auch in der Immunzell-Tumorzell-Interaktion. Gal-7 könnte ebenso wie Gal-1, -3 und -9 [57] eine Rolle als Ligand in Immuncheckpoint-Signalkaskaden spielen. Hier könnten die Gal-7 exprimierenden Makrophagen zudem eine Quelle für extrazelluläres Gal-7, das dann als Ligand zur Verfügung steht, sein.

4.2.3 Siglecs am Beispiel von Siglec-8

Trebo, A., Ditsch, N., Degenhardt, T., Kuhn, C., Rahmeh, M., Schmoeckel, E., Mayr, D., Czogalla, B., Kolben, T., Meister, S., Mahner, S., Jeschke, U., & Hester, A. (2021)

First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer

International journal of molecular sciences, 22(4), 2000. <https://doi.org/10.3390/ijms22042000>

Auch Siglecs zählen zur Familie der Lektine und wurden als Checkpoints auf Immunzellen identifiziert [55]. Für die Analyse im Rahmen dieser Arbeit wurde Siglec-8 für die Untersuchungen ausgewählt. Siglec-8 ist derzeit vor allem für seine Bedeutung auf Eosinophilen bekannt, wird jedoch auch von Mastzellen und Basophilen exprimiert [86]. Es ist ein Biomarker bei allergischen und eosinophilen Erkrankungen, aber auch bei Leukämien [54, 80]. Über Siglec-8 kann eine Apoptose von Eosinophilen vermittelt werden [59, 81]. Im Kontext der Apoptoseinduktion werden Anti-Siglec-8-Antikörper in der Therapie hypereosinophiler Erkrankungen untersucht [23]. Siglec-8 wurde im Gegensatz zu anderen Siglecs [55] meiner Kenntnis nach bislang noch nicht als potenzieller Immuncheckpoint untersucht. Über die Bedeutung der Expression von Siglec-8 auf nicht-Immunzellen und insbesondere in der Tumorbilogie ist bislang wenig bekannt. Es lediglich einzelne Untersuchungen beim klarzelligen Nierenkarzinom und beim Magenkarzinom vor [17, 87]. Eine Bedeutung beim Mammakarzinom ist bislang nicht beschrieben.

Die Expression von Siglec-8 wurde auf 235 primären Mammakarzinomfällen immunhistochemisch bestimmt und mittels IRS semiquantitativ ausgewertet [113]. Neben Vergleichen zu bekannten klinischen und pathologischen Parametern wurde die Siglec-8 Expression mit weiteren, bereits in vorangehenden Untersuchungen an diesem Panel analysierten, potenziell prognostischen Faktoren korreliert. Zudem wurden in der Zellkultur MCF7{ XE "MCF7" \t "Luminal A-like Mammakarzinomzelllinie" }-Mammakarzinomzellen (Luminal A-like [21]) mit u. a. PPAR γ -Liganden stimuliert bzw. ein Siglec-8 Silencing durchgeführt und die Siglec-8 und Gal-7 Expression bestimmt. [113]

Zum ersten Mal überhaupt konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Mammakarzinome Siglec-8 exprimieren (215/235 Fälle, medianer IRS 6). Die Siglec-8 Expression war signifikant höher bei positivem ER-Status ($p = 0,027$) aber auch bei hohem Grading ($p = 0,007$). Im Vergleich der biologischen Subtypen war die Expression beim TNBC am niedrigsten ($p = 0,04$). Weiterhin zeigte sich eine positive Korrelation der Siglec-8 Expression mit Gal-7 (unter 4.2.2 als negativ prognostischer Faktor beschrieben [114]) und mit zytoplasmatischem TA-MUC1 (beim Mammakarzinom als positiver Prognosefaktor beschrieben [49]). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nun gezeigt werden, dass nur in der Subgruppe, die auch hohe Siglec-8 Spiegel exprimierte, diese prognostische Assoziation von TA-MUC1 mit einem längeren Gesamtüberleben ($p = 0,017$) und von Gal-7 mit einem kürzeren

progressionsfreien Überleben ($p = 0,023$) vorlag. In der Subkohorte, die Siglec-8 nicht oder nur gering exprimierte, zeigten Gal-7 und TA-MUC1 keine prognostische Relevanz. Auf zellkultureller Ebene konnte Siglec-8 durch PPAR γ -Liganden induziert werden. Ein Siglec-8 knockdown führte zu einer verringerten Expression von Gal-7. [113]

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit erste Hinweise für eine mögliche Rolle von Siglec-8 beim Mammakarzinom [113]. Siglec-8 wird von Mammakarzinomzellen exprimiert und scheint über PPAR γ reguliert zu werden. Wechselwirkungen zu TA-MUC1 und Gal-7 sind möglich, ebenso wie eine Beeinflussung der Gal-7 Expression durch Siglec-8. Der Einfluss von Siglec-8 auf die Gal-7 Expression könnte mit der Sialinsäure-Bindung von Siglec-8 und dem extra- nach intrazellulärem Shutteling von Gal-7 in Verbindung stehen: Galektine werden extrazellulär durch N-Acetyl-Lactosamine (LacNAc{ XE "LacNAc" \t "*N-Acetyl-Lactosamin*" }) gebunden, die bei Sialylierung die Galektine freigegeben und den Transfer von extra- nach intrazellulär ermöglichen [12, 77]. Siglec-8 kann sialylierte LacNAcs binden und könnte hierdurch den Galektin-Transfer von extra- nach intrazellulär begünstigen [94]. Erhöhte intrazelluläre Gal-7 Spiegel induzieren in Tumorzellen wiederum eine Gal-7 mRNA-Expression [13]. Über diesen Mechanismus könnte der Siglec-8 knockdown zu einer Reduktion der Gal-7 Expression führen. Außerdem könnten durch die Bindung sialylierter LacNAcs durch Siglec-8 und die Freigabe von Gal-7 die extrazellulären Gal-7 Spiegel steigen. Zeigt sich, dass Gal-7 ebenfalls ein Immuncheckpoint-Ligand ist (ebenso wie vergleichbare Galektine [37]) könnte Siglec-8 somit die Konzentration des Immuncheckpoint-Liganden erhöhen und so zu einer Immunsuppression führen. Dies könnte den beobachteten negativ prognostischen Effekt von Gal-7 in der Siglec-8 positiven Subkohorte erklären [113]. Weitere funktionelle Untersuchungen, die Gal-7 und Siglec-8, aber auch weitere Zellen und Strukturen des TMEs beinhalten, müssen diese Hypothesen prüfen. Darüber hinaus kann auch eine Wechselwirkung von Siglec-8 zur chronischen Inflammation im TME bestehen. Siglec-8 wurde durch PPAR γ -Liganden induziert [113]; der Transkriptionsfaktor kann seinerseits über COX2 induziert werden [63]. Somit könnte die chronische Inflammation im TME die Siglec-8 Expression beeinflussen.

5. Zusammenfassende Diskussion und Bedeutung für das Fachgebiet

Die Systemtherapie des Mammakarzinoms konnte in der letzten Zeit durch die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien zunehmend spezifischer gestaltet werden [40]. Die Fokussierung auf biologische Zielstrukturen führt zu einer Individualisierung der Therapie und kann die Prognose günstig beeinflussen. Trotz dieser positiven Entwicklung verbleiben Patient*innen, für die aufgrund der Tumorbiologie derzeit deutlich weniger spezifische Therapieoptionen zur Verfügung stehen, so dass deren Prognose weiterhin ungünstig bleibt. Außerdem können durch Tumorprogression zielgerichtete Therapieoptionen nach einigen Behandlungslinien ausgeschöpft sein. Darüber hinaus kann bei einigen Patient*innen bereits primär ein fehlendes Ansprechen auf die zielgerichtete Therapie auftreten. Bei Untersuchungen zu biologischen Eigenschaften des Mammakarzinoms und möglichen therapeutischen Angriffspunkten ist in letzter Zeit die Bedeutung des TME in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Im TME scheinen unter anderem inflammatorische Prozesse und insbesondere die COX-2-PGE2-Achse eine wichtige Rolle zu spielen [52]. Eine verstärkte Aktivierung dieses COX-2 Signalwegs wurde bei verschiedenen Tumorentitäten mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert [97]. Darüber hinaus spielen im TME Immunzellen und die Tumorzell-Immunzell-Interaktion eine wichtige Rolle [36]. Die Entdeckung der Möglichkeit, die Tumorzell-Immunzell-Interaktionen zu beeinflussen, hat die onkologische Therapie revolutioniert [29]. Bestandteile des TME und der relevanten Signalkaskaden könnten zudem künftig als prognostische Faktoren dienen [76, 105]. Sie könnten zur Entscheidungsfindung beitragen, welche Patient*innen aufgrund eines vermutlich aggressiveren Verlaufs einer intensiveren Therapie bedürfen und bei welchen aufgrund einer günstigeren Prognose eine individualisierte Therapiedeeskalation möglich scheint.

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit wurde die Rolle des EP3-Rezeptors aus der COX-2-PGE2-Signalkaskade insbesondere in Hinblick auf seine prognostische Relevanz untersucht. Beim Mammakarzinom ergaben sich in der Analyse der klinischen Tumorproben Hinweise auf eine positive prognostische Bedeutung von EP3 [103]. In zellkulturellen Versuchen zeigte sich jedoch, dass eine Hemmung des EP3-Rezeptors zu einer Reduktion pro-tumorigener Eigenschaften von Mammakarzinomzellen führte [48]. Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit gynäkologischen Tumoren und deren Vorstufen, bei denen sich jedoch neben den zellkulturellen Versuchen auch bei der Untersuchung von Tumorproben Hinweise auf einen negativen Einfluss des EP3 Rezeptors ergaben [22, 45, 47, 129]. Dies zeigt, dass dem EP3-Rezeptor sowohl beim Mammakarzinom als auch bei gynäkologischen Tumorentitäten eine Bedeutung in Tumorgenese und/oder -progression zukommt. Eine Nutzung als prognostischer Marker scheint möglich. Die genaue Rolle von EP3 unterscheidet sich jedoch vermutlich

zwischen den Entitäten, so dass hier ergänzende Untersuchungen zur Herausarbeitung der Ursachen dieses Unterschieds sinnvoll erscheinen.

Eine Erklärung für die gegensätzliche prognostische Assoziation könnte sein, dass der EP3-Rezeptor im TME bei verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Aufgaben übernimmt. Während EP3 bei einer Tumorentität beispielsweise eine direkte pro-tumorigene Wirkung an der Tumorzelle haben kann [124], könnte bei einer anderen Entität eine Interaktion von EP3 mit dem TME im Vordergrund stehen, wobei es zu letzterer Hypothese bislang keine expliziten Untersuchungen gibt. Daher ist es wichtig, genau zu klären, welche spezifische Rolle neben der COX-2-PGE2-Achse auch die EP-Rezeptoren im TME des Mammakarzinoms einnehmen. Beim EP3-Rezeptor können zudem verschiedene Isoformen eine Rolle spielen [65]. Darüber hinaus sind Wechselwirkungen mit anderen Signalkaskaden möglich. Die divergenten Effekte zwischen der immunhistochemischen Untersuchung klinischer Tumorproben und den zellkulturellen Versuchen beim Mammakarzinom können unter anderem durch das Analysesystem bedingt sein: Zellkulturelle Versuche bilden lediglich ein Modell der klinischen Realität ab [14]. In diesem Modell fehlt das TME mit seinen löslichen Faktoren, dem Stroma und den umgebenden Zellen, auch die dreidimensionale Struktur des Tumors ist nicht abgebildet. Zudem ist die Heterogenität eines einzelnen Tumors in der Zellkultur nicht repräsentiert. Sind das TME oder die dreidimensionale Struktur für die Wirkung eines Rezeptors, wie des EP3-Rezeptors, von Bedeutung und fehlen diese nun im zellkulturellen Modell, so kann es sein, dass dadurch entscheidende funktionelle Aspekte des Rezeptors in der Zellkultur scheinbar verloren gehen. Dem gegenüber können Organoid-Modelle eine genauere Annäherung an die *in vivo*-Realität sein. Daher sind künftig ergänzende Versuche zum EP3-Rezeptor mit Mammakarzinom-Organoiden geplant, um die beobachteten funktionellen Aspekte aus der Zellkultur zu überprüfen und genauer zu evaluieren, durch welche Mechanismen der beobachtete positiv prognostische Effekt erklärt werden kann.

In Hinblick auf das TME und seine prognostische Bedeutung beim Mammakarzinom konnten im Rahmen dieser Habilitationsarbeit weitere wichtige Faktoren identifiziert werden. Es zeigte sich, dass neben den Makrophagen im Tumorstroma auch das vermehrte Vorkommen von Makrophagen im Tumor-assoziierten Fettgewebe, in dieser Arbeit als BATMs bezeichnet, mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert war [70]. Darüber hinaus korrelierte die Anzahl der BATMs mit der EP3-Expression und BATMs zeigten nur in der Subkohorte EP3-negativer Mammakarzinome eine Assoziation zum klinischen Outcome. Diese Arbeit liefert somit wichtige Hinweise auf eine Interaktion von Bestandteilen der chronischen Inflamationsreaktion im TME (des EP3-Rezeptors) mit umgebenden Immunzellen (den BATMs). Möglicherweise liegt hierin auch die positiv prognostische Bedeutung des EP3-Rezeptors beim Mammakarzinom: EP3 könnte das Auftreten oder auch den Phänotyp von

BATMs regulieren und somit deren negativen Einfluss auf die Tumorprogression reduzieren. Da PGE₂ eine Polarisation der Makrophagen zum pro-tumorigenen M2-Subtyp bedingen kann [44], scheint es möglich, dass über den EP3-Rezeptor eine Beeinflussung dieser M2-Polarisierung bewirkt wird. Eine aktuelle Arbeit zu Lebererkrankungen bereits zeigte bereits, dass der EP3-Rezeptor in der Polarisierung zu M2-Makrophagen eine Rolle spielt [82]. Weitere *in vitro*-Untersuchungen mit Kokulturen von Mammakarzinomzellen mit Makrophagen, die auch die Polarisierung der BATMs und ihren möglichen Ursprung untersuchen, sind geplant und sollen diese ersten Beobachtungen weiter überprüfen. Auch hier sollen ggf. Organoid-Modelle genutzt werden, um die klinische Realität besser abzubilden.

Die Ergebnisse zu den BATMs verdeutlichen zudem, wie komplex die Pathomechanismen der Tumorgenese sind und wie groß die Rolle des Fettgewebes im TME sein kann. Ein hoher lokaler Fettgehalt der Brust wurde – ebenso wie Adipositas im Allgemeinen [119] – mit einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom assoziiert [112]. Die genauen Pathomechanismen sind bislang nicht detailliert geklärt, inflammatorische Prozesse im Sinne von CLS spielen aber wahrscheinlich eine Rolle [56, 112]. Weitere geplante Arbeiten werden den Einfluss des lokalen Fettgewebes und der darin enthaltenen Makrophagen weiter beleuchten. Hier scheinen auch Vergleiche zwischen adipösen und normalgewichtigen Patient*innen von Interesse zu sein.

Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit die Lektine Gal-7 (prognostisch negativ) und Gal-8 (prognostisch positiv) als potenzielle prognostische Faktoren identifiziert [114]. Die starke Korrelation zur HER2-Expression und die Assoziation zum klinischen Outcome in der HER2-positiven Subkohorte – so wie dies auch im Mausmodell beschrieben ist [39] – könnte auf eine Wechselwirkung zum HER2-Signalweg hindeuten. Dies zeigt, dass für die Evaluation und Beurteilung prognostischer Marker stets die spezifische Tumorbiologie berücksichtigt werden muss und dass das Mammakarzinom biologisch gesehen nicht einfach „über einen Kamm geschoren“ werden kann. Durch Kombinationen prognostischer Marker, wie in dieser Arbeit Gal-7 und Gal-8, können Subgruppen mit besonders günstigem oder schlechtem klinischem Verlauf identifiziert werden [114]. Dies ist für die Therapieindividualisierung von wichtiger Bedeutung. Die funktionelle Bedeutung von Gal-7 oder Gal-8 könnte, wie für andere Galektine beschrieben, in einer Wechselwirkung zur COX-2 Achse liegen [20, 26]. Hier könnten auch Gal-7 exprimierende TAMs eine Rolle spielen [51, 114, 121]. Zudem scheint für weiterführende Untersuchungen eine Prüfung der Rolle von Gal-7 und Gal-8 in der Immunzell-Tumorzell-Interaktion von Bedeutung [57]. Nach Klärung der funktionellen Zusammenhänge zwischen Galektinen, Immunzellen und der chronischen Inflammationsreaktion können sich neue therapeutische Optionen eröffnen. Hier ist beispielsweise eine Kombination von Galektin-Inhibitoren mit Checkpoint-Inhibitoren oder Inhibitoren der COX-2-Kaskade denkbar.

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass aus der Gruppe der Lektine auch Siglec-8 durch Mammakarzinome exprimiert wird und dieses für prognostische Abschätzungen bedeutsam sein kann [113]. Es zeigte sich zudem eine Assoziation von Siglec-8 zu den prognostischen Faktoren Gal-7 und TA-MUC1. Auf Immunzellen exprimierte Siglecs sind als Immuncheckpoints bekannt [55]; analog könnte Siglec-8 selbst als Immuncheckpoint wirken oder über die Interaktion mit Gal-7 dessen Verfügbarkeit als potenziellen Immuncheckpoint-Liganden beeinflussen. Eine Assoziation von Siglec-8 mit der COX-2-Signalkaskade scheint über PPAR γ möglich. Weitere funktionelle Untersuchungen sollen die Bedeutung der Siglec-8-Expression beim Mammakarzinom, das einen Fall einer bislang selten beschriebenen Expression bei nicht-Immunzellen darstellt, weiter klären.

Insgesamt verdichten sich die Hinweise auf eine Interaktion von chronischer Inflammation und Tumorzell-Immunzell-Interaktion im TME. Beispielhaft genannt sei hier, dass COX-2 PPAR γ induzieren kann, einen Kernrezeptor, der wiederum Siglec-8 induzierte [63, 113]. COX-2 kann außerdem durch MUC1 induziert werden, welches wiederum ein Ligand für Galektine oder Siglecs darstellt [9, 83, 91]. Siglecs und Galektine sind als Immuncheckpoints bzw. deren Liganden beschrieben [10, 57]. Makrophagen im TME interagieren mit COX-2 und korrelieren mit EP3, exprimieren aber wiederum Gal-7 [70, 114, 121]. Diese verschiedenen Beispiele zu Assoziationen und Korrelationen aus den vorliegenden Arbeiten, aber auch aus der Literatur, zeigen die Komplexität möglicher Wechselwirkungen zwischen chronischer Inflammation und Tumorzell-Immunzell-Interaktion. Kenntnisse über Wechselwirkungen zwischen Inflammation und Immunzell-Tumorzell-Interaktion können unter anderem wichtig sein, um Ursachen von Resistenzen auf Checkpoint-Inhibitor-Therapien zu verstehen. Darüber hinaus könnten Optionen dualer Therapiekonzepte mit Checkpoint-Blockade und paralleler Hemmung der Inflammation geprüft werden [36].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass diese Arbeit wichtige Grundlagen zur Bedeutung des TME beim Mammakarzinom, insbesondere in Hinblick auf prognostisch relevante Parameter, schafft. Die untersuchten Strukturen können künftig ggf. als prognostische Faktoren zur Therapieentscheidung oder als spezifische therapeutische Targets zur Verfügung stehen. Weiterhin verstärkt diese Arbeit die Hinweise auf eine Interaktion der chronischen Inflammation mit verschiedenen Signalkaskaden, Immunzellen und Immuncheckpoints. Meine Hoffnung und Antrieb ist, mit meiner Forschung dazu beizutragen, durch individualisierte, nebenwirkungsarme, aber dennoch wirksame Therapien, die Behandlung von Mammakarzinompatient*innen kontinuierlich zu verbessern.

6. Literatur

1. Abcam, *Datasheet Sulprostone, EP1/EP3 receptor agonist ab120907*. <https://www.abcam.com/sulprostone-ep1-ep3-receptor-agonist-ab120907.html>. Zuletzt abgerufen am 30.07.2021.
2. Abdelhakam, D.A., H. Hanna, and A. Nassar, *Oncotype DX and Prosigna in breast cancer patients: A comparison study*. *Cancer Treat Res Commun*, 2021. **26**: p. 100306.
3. Ali-Fehmi, R., R.T. Morris, S. Bandyopadhyay, M. Che, V. Schimp, J.M. Malone, Jr., and A.R. Munkarah, *Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival*. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **192**(3): p. 819-25.
4. Alsuliman, A., D. Colak, O. Al-Harazi, H. Fitwi, A. Tulbah, T. Al-Tweigeri, M. Al-Alwan, and H. Ghebeh, *Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells*. *Mol Cancer*, 2015. **14**: p. 149.
5. Amano, H., Y. Ito, T. Suzuki, S. Kato, Y. Matsui, F. Ogawa, T. Murata, Y. Sugimoto, R. Senior, H. Kitasato, I. Hayashi, Y. Satoh, S. Narumiya, and M. Majima, *Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(12): p. 2318-24.
6. Badawi, A.F. and M.Z. Badr, *Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ and levels of prostaglandin E2 and 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis*. *International Journal of Cancer*, 2003. **103**(1): p. 84-90.
7. Barondes, S.H., D.N. Cooper, M.A. Gitt, and H. Leffler, *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
8. Bartova, M., F. Ondrias, T. Muy-Kheng, M. Kastner, C. Singer, and K. Pohlodek, *COX-2, p16 and Ki67 expression in DCIS, microinvasive and early invasive breast carcinoma with extensive intraductal component*. *Bratisl Lek Listy*, 2014. **115**(7): p. 445-51.
9. Beatson, R., V. Tajadura-Ortega, D. Achkova, G. Picco, T.D. Tsourouktsoglou, S. Klausning, M. Hillier, J. Maher, T. Noll, P.R. Crocker, J. Taylor-Papadimitriou, and J.M. Burchell, *The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(11): p. 1273-1281.
10. Benmerzoug, S., M.F. Chevalier, M. Verardo, S. Nguyen, V. Cesson, A.K. Schneider, F. Dartiguenave, S.C. Rodrigues-Dias, I. Lucca, P. Jichlinski, B. Roth, D. Nardelli-Haeffliger, and L. Derré, *Siglec-6 as a New Potential Immune Checkpoint for Bladder Cancer Patients*. *Eur Urol Focus*, 2021.
11. Bertagnolli, M.M., C.J. Eagle, A.G. Zauber, M. Redston, S.D. Solomon, K. Kim, J. Tang, R.B. Rosenstein, J. Wittes, D. Corle, T.M. Hess, G.M. Woloj, F. Boissarie, W.F. Anderson, J.L. Viner, D. Bagheri, J. Burn, D.C. Chung, T. Dewar, T.R. Foley, N. Hoffman, F. Macrae, R.E. Pruitt, J.R. Saltzman, B. Salzberg, T. Sylwestrowicz, G.B. Gordon, and E.T. Hawk, *Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(9): p. 873-84.
12. Bhat, R., B. Belardi, H. Mori, P. Kuo, A. Tam, W.C. Hines, Q.T. Le, C.R. Bertozzi, and M.J. Bissell, *Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(33): p. E4820-7.
13. Bibens-Laulan, N. and Y. St-Pierre, *Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7*. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0187194.

14. Boix-Montesinos, P., P.M. Soriano-Teruel, A. Armiñán, M. Orzáez, and M.J. Vicent, *The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021. **173**: p. 306-330.
15. Boussiotis, V.A., *Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(18): p. 1767-1778.
16. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2017: John Wiley & Sons.
17. Cao, Y., H. Liu, H. Zhang, C. Lin, R. Li, W. Zhang, Z. Shen, and J. Xu, *Decreased expression of Siglec-8 associates with poor prognosis in patients with gastric cancer after surgical resection*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(8): p. 10883-91.
18. Cheuk, I.W., V.Y. Shin, M.T. Siu, J.Y. Tsang, J.C. Ho, J. Chen, G.M. Tse, X. Wang, and A. Kwong, *Association of EP2 receptor and SLC19A3 in regulating breast cancer metastasis*. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(11): p. 3389-99.
19. Choi, J., J. Gyamfi, H. Jang, and J.S. Koo, *The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology*. *Histol Histopathol*, 2018. **33**(2): p. 133-145.
20. Chung, L.Y., S.J. Tang, G.H. Sun, T.Y. Chou, T.S. Yeh, S.L. Yu, and K.H. Sun, *Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(15): p. 4037-47.
21. COMŞA, Ş., A.M. CÎMPEAN, and M. RAICA, *The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research*. *Anticancer Research*, 2015. **35**(6): p. 3147-3154.
22. Czogalla, B., C. Kuhn, S. Heublein, E. Schmockel, D. Mayr, T. Kolben, F. Trillsch, A. Burges, S. Mahner, U. Jeschke, and A. Hester, *EP3 receptor is a prognostic factor in TA-MUC1-negative ovarian cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019. **145**(10): p. 2519-2527.
23. Dellon, E.S., K.A. Peterson, J.A. Murray, G.W. Falk, N. Gonsalves, M. Chegade, R.M. Genta, J. Leung, P. Khoury, A.D. Klion, S. Hazan, M. Vaezi, A.C. Bledsoe, S.R. Durrani, C. Wang, C. Shaw, A.T. Chang, B. Singh, A.P. Kamboj, H.S. Rasmussen, M.E. Rothenberg, and I. Hirano, *Anti-Siglec-8 Antibody for Eosinophilic Gastritis and Duodenitis*. *N Engl J Med*, 2020. **383**(17): p. 1624-1634.
24. Demers, M., A.A. Rose, A.A. Grosset, K. Biron-Pain, L. Gaboury, P.M. Siegel, and Y. St-Pierre, *Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(6): p. 3023-31.
25. Dian, D., M. Lenhard, D. Mayr, S. Heublein, U. Karsten, S. Goletz, C. Kuhn, I. Wiest, K. Friese, T. Weissenbacher, and U. Jeschke, *Staining of MUC1 in ovarian cancer tissues with PankoMab-GEX detecting the tumour-associated epitope, TA-MUC1, as compared to antibodies HMFG-1 and 115D8*. *Histol Histopathol*, 2013. **28**(2): p. 239-44.
26. Dietlmeier, S., Y. Ye, C. Kuhn, A. Vattai, T. Vilsmaier, L. Schröder, B.P. Kost, J. Gallwas, U. Jeschke, S. Mahner, and H.H. Heidegger, *The prostaglandin receptor EP2 determines prognosis in EP3-negative and galectin-3-high cervical cancer cases*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 1154.
27. Dongre, A., M. Rashidian, F. Reinhardt, A. Bagnato, Z. Keckesova, H.L. Ploegh, and R.A. Weinberg, *Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas*. *Cancer Res*, 2017. **77**(15): p. 3982-3989.
28. Duffy, M.J., S. Shering, F. Sherry, E. McDermott, and N. O'Higgins, *CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer*. *Int J Biol Markers*, 2000. **15**(4): p. 330-3.

29. Emens, L.A., S. Adams, C.H. Barrios, V. Diéras, H. Iwata, S. Loi, H.S. Rugo, A. Schneeweiss, E.P. Winer, S. Patel, V. Henschel, A. Swat, M. Kaul, L. Molinero, S. Patel, S.Y. Chui, and P. Schmid, *First-line atezolizumab plus nab-paclitaxel for unresectable, locally advanced, or metastatic triple-negative breast cancer: IMpassion130 final overall survival analysis*. *Ann Oncol*, 2021. **32**(8): p. 983-993.
30. Evrard, D., P. Szturz, A. Tijeras-Raballand, L. Astorgues-Xerri, C. Abitbol, V. Paradis, E. Raymond, S. Albert, B. Barry, and S. Faivre, *Macrophages in the microenvironment of head and neck cancer: potential targets for cancer therapy*. *Oral Oncol*, 2019. **88**: p. 29-38.
31. Faria, S.S., L.H. Corrêa, G.S. Heyn, L.P. de Sant'Ana, R.D.N. Almeida, and K.G. Magalhães, *Obesity and Breast Cancer: The Role of Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue in Tumor Progression, Prognosis, and Therapy*. *J Breast Cancer*, 2020. **23**(3): p. 233-245.
32. Ferragut, F., A.J. Cagnoni, L.L. Colombo, C. Sánchez Terrero, C. Wolfenstein-Todel, M.F. Troncoso, S.I. Vanzulli, G.A. Rabinovich, K.V. Mariño, and M.T. Elola, *Dual knockdown of Galectin-8 and its glycosylated ligand, the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166), synergistically delays in vivo breast cancer growth*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019. **1866**(8): p. 1338-1352.
33. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **59**(1): p. 221-6.
34. Fukushima, M., K. Higuchi, H. Shimojo, T. Uehara, and H. Ota, *Distinct Cytoplasmic Expression of KL-6 Mucin in Chromophobe Renal Cell Carcinoma: A Comparative Immunohistochemical Study with Other Renal Epithelial Cell Tumors*. *Acta Histochem Cytochem*, 2012. **45**(5): p. 301-8.
35. Giancchetti, E., A. Arena, and A. Fierabracci, *Sialic Acid-Siglec Axis in Human Immune Regulation, Involvement in Autoimmunity and Cancer and Potential Therapeutic Treatments*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
36. Gómez-Valenzuela, F., E. Escobar, R. Pérez-Tomás, and V.P. Montecinos, *The Inflammatory Profile of the Tumor Microenvironment, Orchestrated by Cyclooxygenase-2, Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 686792.
37. Gonçalves Silva, I., L. Rüegg, B.F. Gibbs, M. Bardelli, A. Fruehwirth, L. Varani, S.M. Berger, E. Fasler-Kan, and V.V. Sumbayev, *The immune receptor Tim-3 acts as a trafficker in a Tim-3/galectin-9 autocrine loop in human myeloid leukemia cells*. *Oncol Immunology*, 2016. **5**(7): p. e1195535.
38. Grommes, C., G.E. Landreth, and M.T. Heneka, *Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(7): p. 419-29.
39. Grosset, A.A., F. Poirier, L. Gaboury, and Y. St-Pierre, *Galectin-7 Expression Potentiates HER-2-Positive Phenotype in Breast Cancer*. *PLoS One*, 2016. **11**(11): p. e0166731.
40. Harbeck, N., F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K. Ruddy, J. Tsang, and F. Cardoso, *Breast cancer*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 66.
41. Harris, E.E.R., *Precision Medicine for Breast Cancer: The Paths to Truly Individualized Diagnosis and Treatment*. *International Journal of Breast Cancer*, 2018. **2018**: p. 4809183.
42. Harris, R.E., *Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*. *Inflammopharmacology*, 2009. **17**(2): p. 55-67.
43. Harris, R.E., B.C. Casto, and Z.M. Harris, *Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer*. *World J Clin Oncol*, 2014. **5**(4): p. 677-92.

44. Hashemi Goradel, N., M. Najafi, E. Salehi, B. Farhood, and K. Mortezaee, *Cyclooxygenase-2 in cancer: A review*. J Cell Physiol, 2019. **234**(5): p. 5683-5699.
45. Heidegger, H., S. Dietlmeier, Y. Ye, C. Kuhn, A. Vattai, C. Aberl, U. Jeschke, S. Mahner, and B. Kost, *The Prostaglandin EP3 Receptor Is an Independent Negative Prognostic Factor for Cervical Cancer Patients*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
46. Herfs, M., L. Herman, P. Hubert, F. Minner, M. Arafa, P. Roncarati, Y. Henrotin, J. Boniver, and P. Delvenne, *High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(4): p. 603-14.
47. Hester, A., M. Ritzer, C. Kuhn, E. Schmoeckel, D. Mayr, T. Kolben, C. Dannecker, S. Mahner, U. Jeschke, and T.M. Kolben, *The role of EP3-receptor expression in cervical dysplasia*. J Cancer Res Clin Oncol, 2018.
48. Hester, A., B. Salzmann, M. Rahmeh, T. Kolben, B. Czogalla, N. Ditsch, S. Mahner, U. Jeschke, and T.M. Kolben, *EP3 receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 6053-6068.
49. Heublein, S., D. Mayr, M. Egger, U. Karsten, S. Goletz, M. Angele, J. Gallwas, U. Jeschke, and N. Ditsch, *Immunoreactivity of the fully humanized therapeutic antibody PankoMab-GEX™ is an independent prognostic marker for breast cancer patients*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**(1): p. 50.
50. Heublein, S., S. Page, D. Mayr, E. Schmoeckel, F. Trillsch, F. Marme, S. Mahner, U. Jeschke, and A. Vattai, *Potential Interplay of the Gatipotuzumab Epitope TA-MUC1 and Estrogen Receptors in Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
51. Hou, Z., D.J. Falcone, K. Subbaramaiah, and A.J. Dannenberg, *Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1 β autoamplification*. Carcinogenesis, 2011. **32**(5): p. 695-702.
52. Howe, L.R., *Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(4): p. 210.
53. Huang, H.F., P. Shu, T.F. Murphy, S. Aisner, V.A. Fitzhugh, and M.L. Jordan, *Significance of divergent expression of prostaglandin EP4 and EP3 receptors in human prostate cancer*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(4): p. 427-39.
54. Hudson, S.A., H. Herrmann, J. Du, P. Cox, B. Haddad el, B. Butler, P.R. Crocker, S.J. Ackerman, P. Valent, and B.S. Bochner, *Developmental, malignancy-related, and cross-species analysis of eosinophil, mast cell, and basophil siglec-8 expression*. J Clin Immunol, 2011. **31**(6): p. 1045-53.
55. Ibarlucea-Benitez, I., P. Weitzenfeld, P. Smith, and J.V. Ravetch, *Siglecs-7/9 function as inhibitory immune checkpoints in vivo and can be targeted to enhance therapeutic antitumor immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(26).
56. Iyengar, N.M., X.K. Zhou, A. Gucalp, P.G. Morris, L.R. Howe, D.D. Giri, M. Morrow, H. Wang, M. Pollak, L.W. Jones, C.A. Hudis, and A.J. Dannenberg, *Systemic Correlates of White Adipose Tissue Inflammation in Early-Stage Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(9): p. 2283-9.
57. Jin, Q.Y., Y.S. Li, X.H. Qiao, J.W. Yang, and X.L. Guo, *Targeting galectins in T cell-based immunotherapy within tumor microenvironment*. Life Sci, 2021. **277**: p. 119426.

58. Kandel, S., P. Adhikary, G. Li, and K. Cheng, *The TIM3/Gal9 signaling pathway: An emerging target for cancer immunotherapy*. *Cancer Lett*, 2021. **510**: p. 67-78.
59. Kano, G., M. Almanan, B.S. Bochner, and N. Zimmermann, *Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **132**(2): p. 437-45.
60. Karachaliou, N., M.G. Cao, C. Teixidó, S. Viteri, D. Morales-Espinosa, M. Santarpia, and R. Rosell, *Understanding the function and dysfunction of the immune system in lung cancer: the role of immune checkpoints*. *Cancer Biol Med*, 2015. **12**(2): p. 79-86.
61. Kashiwagi, E., M. Shiota, A. Yokomizo, M. Itsumi, J. Inokuchi, T. Uchiumi, and S. Naito, *Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2013. **20**(3): p. 431-41.
62. Kawamori, T., N. Uchiya, S. Nakatsugi, K. Watanabe, S. Ohuchida, H. Yamamoto, T. Maruyama, K. Kondo, T. Sugimura, and K. Wakabayashi, *Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(12): p. 2001-4.
63. Knopfová, L. and J. Smarda, *The use of Cox-2 and PPAR γ signaling in anti-cancer therapies*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2010. **1**(2): p. 257-264.
64. Kölbl, A.C., U. Andergassen, and U. Jeschke, *The Role of Glycosylation in Breast Cancer Metastasis and Cancer Control*. *Frontiers in Oncology*, 2015. **5**(219).
65. Kotani, M., I. Tanaka, Y. Ogawa, T. Usui, K. Mori, A. Ichikawa, S. Narumiya, T. Yoshimi, and K. Nakao, *Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions*. *Mol Pharmacol*, 1995. **48**(5): p. 869-79.
66. Kuang, D.M., Q. Zhao, C. Peng, J. Xu, J.P. Zhang, C. Wu, and L. Zheng, *Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1*. *J Exp Med*, 2009. **206**(6): p. 1327-37.
67. Läsche, M., H. Urban, J. Gallwas, and C. Gründker, *HPV and Other Microbiota; Who's Good and Who's Bad: Effects of the Microbial Environment on the Development of Cervical Cancer-A Non-Systematic Review*. *Cells*, 2021. **10**(3).
68. Lee, J.S., Y. Lee, B. Jeon, Y. Jeon, H. Yoo, and T.Y. Kim, *EC-SOD induces apoptosis through COX-2 and galectin-7 in the epidermis*. *J Dermatol Sci*, 2012. **65**(2): p. 126-33.
69. Li, L., Y. Lv, and D. Yan, *Inhibition of Ep3 attenuates migration and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer cells via suppression of TGF- β /Smad signaling*. *Oncol Lett*, 2018. **16**(5): p. 5645-5654.
70. Lin, L., C. Kuhn, N. Ditsch, T. Kolben, B. Czogalla, S. Beyer, F. Trillsch, E. Schmoeckel, D. Mayr, S. Mahner, U. Jeschke, and A. Hester, *Breast adipose tissue macrophages (BATMs) have a stronger correlation with breast cancer survival than breast tumor stroma macrophages (BTSMs)*. *Breast Cancer Res*, 2021. **23**(1): p. 45.
71. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(1): p. 29-41.
72. Lu, W. and Y. Kang, *Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis*. *Dev Cell*, 2019. **49**(3): p. 361-374.

73. Ma, X., N. Kundu, O.B. Ioffe, O. Goloubeva, R. Konger, C. Baquet, P. Gimotty, J. Reader, and A.M. Fulton, *Prostaglandin E receptor EP1 suppresses breast cancer metastasis and is linked to survival differences and cancer disparities*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(10): p. 1310-8.
74. Majumder, M., P. Nandi, A. Omar, K.C. Ugwuagbo, and P.K. Lala, *EP4 as a Therapeutic Target for Aggressive Human Breast Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(4).
75. Matsumura, N., M. Yamamoto, A. Aruga, K. Takasaki, and M. Nakano, *Correlation between expression of MUC1 core protein and outcome after surgery in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Cancer*, 2002. **94**(6): p. 1770-6.
76. Medrek, C., F. Pontén, K. Jirström, and K. Leandersson, *The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 306.
77. Morris, S., N. Ahmad, S. André, H. Kaltner, H.J. Gabius, M. Brenowitz, and F. Brewer, *Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7*. *Glycobiology*, 2004. **14**(3): p. 293-300.
78. Mukherjee, P., G.D. Basu, T.L. Tindler, D.B. Subramani, J.M. Bradley, M. Arefayene, T. Skaar, and G. De Petris, *Progression of pancreatic adenocarcinoma is significantly impeded with a combination of vaccine and COX-2 inhibition*. *J Immunol*, 2009. **182**(1): p. 216-24.
79. Munir, M.T., M.K. Kay, M.H. Kang, M.M. Rahman, A. Al-Harrasi, M. Choudhury, N. Moustaid-Moussa, F. Hussain, and S.M. Rahman, *Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(12).
80. Na, H.J., R.G. Hamilton, A.D. Klion, and B.S. Bochner, *Biomarkers of eosinophil involvement in allergic and eosinophilic diseases: review of phenotypic and serum markers including a novel assay to quantify levels of soluble Siglec-8*. *J Immunol Methods*, 2012. **383**(1-2): p. 39-46.
81. Na, H.J., S.A. Hudson, and B.S. Bochner, *IL-33 enhances Siglec-8 mediated apoptosis of human eosinophils*. *Cytokine*, 2012. **57**(1): p. 169-74.
82. Nakamoto, S., Y. Ito, N. Nishizawa, T. Goto, K. Kojo, Y. Kumamoto, M. Watanabe, S. Narumiya, and M. Majima, *EP3 signaling in dendritic cells promotes liver repair by inducing IL-13-mediated macrophage differentiation in mice*. *Faseb j*, 2020. **34**(4): p. 5610-5627.
83. Nath, S., L.D. Roy, P. Grover, S. Rao, and P. Mukherjee, *Mucin 1 Regulates Cox-2 Gene in Pancreatic Cancer*. *Pancreas*, 2015. **44**(6): p. 909-17.
84. Neil, J.R., K.M. Johnson, R.A. Nemenoff, and W.P. Schieman, *Cox-2 inactivates Smad signaling and enhances EMT stimulated by TGF-beta through a PGE2-dependent mechanisms*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(11): p. 2227-35.
85. O'Reilly, M.K. and J.C. Paulson, *Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. **30**(5): p. 240-8.
86. O'Sullivan, J.A., A.T. Chang, B.A. Youngblood, and B.S. Bochner, *Eosinophil and mast cell Siglecs: From biology to drug target*. *J Leukoc Biol*, 2020. **108**(1): p. 73-81.
87. Ou, C., L. Liu, J. Wang, S. Dai, Y. Qu, Y. Xiong, W. Xi, J. Xu, and J. Guo, *Enhancement of Siglec-8 expression predicts adverse prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma*. *Urol Oncol*, 2017. **35**(10): p. 607.e1-607.e8.
88. Pereira, J.X., S.N. Dos Santos, T.C. Pereira, M. Cabanel, R. Chammas, F.L. de Oliveira, E.S. Bernardes, and M.C. El-Cheikh, *Galectin-3 Regulates the Expression of Tumor*

- Glycosaminoglycans and Increases the Metastatic Potential of Breast Cancer*. J Oncol, 2019. **2019**: p. 9827147.
89. Pernas, S. and S.M. Tolaney, *Management of Early-Stage Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer*. JCO Oncol Pract, 2021. **17**(6): p. 320-330.
90. Perou, C.M., T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.-L. Børresen-Dale, P.O. Brown, and D. Botstein, *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-752.
91. Piyush, T., A.R. Chacko, P. Sindrewicz, J. Hilken, J.M. Rhodes, and L.-G. Yu, *Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells*. Cell death and differentiation, 2017. **24**(11): p. 1937-1947.
92. Poh, A.R. and M. Ernst, *Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 49.
93. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1423-37.
94. Rapoport, E.M., G.V. Pazynina, M.A. Sablina, P.R. Crocker, and N.V. Bovin, *Probing sialic acid binding Ig-like lectins (siglecs) with sulfated oligosaccharides*. Biochemistry (Mosc), 2006. **71**(5): p. 496-504.
95. Rask, K., Y. Zhu, W. Wang, L. Hedin, and K. Sundfeldt, *Ovarian epithelial cancer: a role for PGE2-synthesis and signalling in malignant transformation and progression*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 62.
96. Reader, J., D. Holt, and A. Fulton, *Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(3-4): p. 449-63.
97. Ristimäki, A., A. Sivula, J. Lundin, M. Lundin, T. Salminen, C. Haglund, H. Joensuu, and J. Isola, *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 632-5.
98. Robertson, F.M., A.M. Simeone, A. Lucci, J.S. McMurray, S. Ghosh, and M. Cristofanilli, *Differential regulation of the aggressive phenotype of inflammatory breast cancer cells by prostanoid receptors EP3 and EP4*. Cancer, 2010. **116**(11 Suppl): p. 2806-14.
99. Rozic, J.G., C. Chakraborty, and P.K. Lala, *Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis*. Int J Cancer, 2001. **93**(4): p. 497-506.
100. Sada, O., K. Ahmed, A. Jeldo, and M. Shafi, *Role of Anti-inflammatory Drugs in the Colorectal Cancer*. Hosp Pharm, 2020. **55**(3): p. 168-180.
101. Schulz, H., C. Kuhn, S. Hofmann, D. Mayr, S. Mahner, U. Jeschke, and E. Schmoeckel, *Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
102. Schulz, H., E. Schmoeckel, C. Kuhn, S. Hofmann, D. Mayr, S. Mahner, and U. Jeschke, *Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
103. Semmlinger, A., V. von Schoenfeldt, V. Wolf, A. Meuter, T.M. Kolben, T. Kolben, C. Zeder-Goess, F. Weis, J. Gallwas, R. Wuerstlein, K. Hermelink, E. Schmoeckel, N. Harbeck, D. Mayr, S. Mahner, U. Jeschke, and N. Ditsch, *EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is*

- a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer.* BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 431.
104. Shao, W., C. Kuhn, D. Mayr, N. Ditsch, M. Kailuwait, V. Wolf, N. Harbeck, S. Mahner, U. Jeschke, V. Cavallès, and S. Sixou, *Cytoplasmic PPAR γ is a marker of poor prognosis in patients with Cox-1 negative primary breast cancers.* Journal of Translational Medicine, 2020. **18**(1): p. 94.
105. Shimizu, K., R. Okita, S. Saisho, A. Maeda, Y. Nojima, and M. Nakata, *Prognostic value of Cox-2 and PD-L1 expression and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes in resected lung adenocarcinoma.* Cancer Manag Res, 2017. **9**: p. 741-750.
106. Soundararajan, R., J. Fradette, J. Konen, S. Moulder, X. Zhang, D. Gibbons, N. Varadarajan, I. Wistuba, D. Tripathy, C. Bernatchez, L. Byers, J. Chang, A. Contreras, B. Lim, E. Parra, E. Roarty, J. Wang, F. Yang, M. Barton, and S. Mani, *Targeting the Interplay between Epithelial-to-Mesenchymal-Transition and the Immune System for Effective Immunotherapy.* Cancers, 2019. **11**: p. 714.
107. Sousa, S., R. Brion, M. Lintunen, P. Kronqvist, J. Sandholm, J. Mönkkönen, P.L. Kellokumpu-Lehtinen, S. Lauttia, O. Tynninen, H. Joensuu, D. Heymann, and J.A. Määttä, *Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status.* Breast Cancer Res, 2015. **17**(1): p. 101.
108. Spinella, F., L. Rosanò, V. Di Castro, P.G. Natali, and A. Bagnato, *Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion.* J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46700-5.
109. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors.* J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
110. Sun, D., M. Bai, Y. Jiang, M. Hu, S. Wu, W. Zheng, and Z. Zhang, *Roles of follicle stimulating hormone and its receptor in human metabolic diseases and cancer.* Am J Transl Res, 2020. **12**(7): p. 3116-3132.
111. Sung, H., J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
112. Tiainen, S., A. Masarwah, S. Oikari, K. Rilla, K. Hämäläinen, M. Sudah, A. Sutela, R. Vanninen, J. Ikonen, R. Tammi, M. Tammi, and P. Auvinen, *Tumor microenvironment and breast cancer survival: combined effects of breast fat, M2 macrophages and hyaluronan create a dismal prognosis.* Breast Cancer Res Treat, 2020. **179**(3): p. 565-575.
113. Trebo, A., N. Ditsch, T. Degenhardt, C. Kuhn, M. Rahmeh, E. Schmoeckel, D. Mayr, B. Czogalla, T. Kolben, S. Meister, S. Mahner, U. Jeschke, and A. Hester, *First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(4).
114. Trebo, A., N. Ditsch, C. Kuhn, H.H. Heidegger, C. Zeder-Goess, T. Kolben, B. Czogalla, E. Schmoeckel, S. Mahner, U. Jeschke, and A. Hester, *High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients.* Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
115. Utsunomiya, T., S. Yonezawa, H. Sakamoto, H. Kitamura, S. Hokita, T. Aiko, S. Tanaka, T. Irimura, Y.S. Kim, and E. Sato, *Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the patients.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(11): p. 2605-14.
116. Varki, A. and T. Angata, *Siglecs--the major subfamily of I-type lectins.* Glycobiology, 2006. **16**(1): p. 1r-27r.

117. Varki, A., R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, in *Essentials of Glycobiology*. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright © 2009, The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.: Cold Spring Harbor (NY).
118. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-93.
119. Widschwendter, P., T.W. Friedl, L. Schwentner, N. DeGregorio, B. Jaeger, A. Schramm, I. Bekes, M. Deniz, K. Lato, T. Weissenbacher, B. Kost, U. Andergassen, J. Jueckstock, J. Neugebauer, E. Trapp, P.A. Fasching, M.W. Beckmann, A. Schneeweiss, I. Schrader, B. Rack, W. Janni, and C. Scholz, *The influence of obesity on survival in early, high-risk breast cancer: results from the randomized SUCCESS A trial*. Breast Cancer Res, 2015. **17**(1): p. 129.
120. Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7908-16.
121. Xun, X., C. Zhang, S. Wang, S. Hu, X. Xiang, Q. Cheng, Z. Li, Y. Wang, and J. Zhu, *Cyclooxygenase-2 expressed hepatocellular carcinoma induces cytotoxic T lymphocytes exhaustion through M2 macrophage polarization*. Am J Transl Res, 2021. **13**(5): p. 4360-4375.
122. Yang, R., L. Sun, C.-F. Li, Y.-H. Wang, J. Yao, H. Li, M. Yan, W.-C. Chang, J.-M. Hsu, J.-H. Cha, J.L. Hsu, C.-W. Chou, X. Sun, Y. Deng, C.-K. Chou, D. Yu, and M.-C. Hung, *Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 832.
123. Yasinska, I.M., S.S. Sakhnevych, L. Pavlova, A. Teo Hansen Selnø, A.M. Teuscher Abeleira, O. Benlaouer, I. Gonçalves Silva, M. Mosimann, L. Varani, M. Bardelli, R. Hussain, G. Siligardi, D. Cholewa, S.M. Berger, B.F. Gibbs, Y.A. Ushkaryov, E. Fasler-Kan, E. Klenova, and V.V. Sumbayev, *The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**(1594).
124. Ye, Y., L. Peng, A. Vattai, E. Deuster, C. Kuhn, C. Dannecker, S. Mahner, U. Jeschke, V. von Schönfeldt, and H.H. Heidegger, *Prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) signaling promotes migration of cervical cancer via urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)*. J Cancer Res Clin Oncol, 2020. **146**(9): p. 2189-2203.
125. Ye, Y., X. Wang, U. Jeschke, and V. von Schönfeldt, *COX-2-PGE(2)-EPs in gynecological cancers*. Archives of gynecology and obstetrics, 2020. **301**(6): p. 1365-1375.
126. Yonezawa, S. and E. Sato, *Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential*. Pathol Int, 1997. **47**(12): p. 813-30.
127. Yu, S., T. Kim, K.H. Yoo, and K. Kang, *The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **486**(3): p. 752-758.
128. Zhao, Y., C.K. Lee, C.H. Lin, R.B. Gassen, X. Xu, Z. Huang, C. Xiao, C. Bonorino, L.F. Lu, J.D. Bui, and E. Hui, *PD-L1:CD80 Cis-Heterodimer Triggers the Co-stimulatory Receptor CD28 While Repressing the Inhibitory PD-1 and CTLA-4 Pathways*. Immunity, 2019. **51**(6): p. 1059-1073.e9.
129. Zhu, J., F. Trillsch, D. Mayr, C. Kuhn, M. Rahmeh, S. Hofmann, M. Vogel, S. Mahner, U. Jeschke, and V. von Schönfeldt, *Prostaglandin receptor EP3 regulates cell proliferation and migration with impact on survival of endometrial cancer patients*. Oncotarget, 2018. **9**(1): p. 982-994.

7. Abkürzungsverzeichnis

BATM	<i>breast adipose tissue macrophage, Makrophage im tumor-umgebenden Fettgewebe</i>
BTSM	<i>breast tumor-stroma macrophage, Makrophage im Tumorstroma</i>
CA	<i>Cancer Antigen</i>
cAMP	<i>zyklisches Adenosinmonophosphat</i>
cc	<i>Korrelationskoeffizient</i>
CIN	<i>zervikale intraepitheliale Neoplasie</i>
CLS	<i>crown-like structure</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase</i>
CRD	<i>carbohydrate-recognition domain</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymale Transition</i>
EP-Rezeptor	<i>Prostaglandin E-Rezeptor</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
ERK	<i>extracellular-signal Regulated Kinase</i>
G	<i>Grading</i>
Gal	<i>Galektin</i>
Gi-Protein	<i>inhibitorisches G-Protein</i>
G-Protein	<i>Guanosintriphosphat-bindendes Protein</i>
Gq-Protein	<i>PLC-gekoppeltes G-Protein</i>
Gs-Protein	<i>stimulatorisches G-Protein</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	<i>Hormonrezeptor</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRS	<i>immunreaktiver Score</i>
L798,106	<i>ein selektiver EP3-Antagonist</i>
LacNAc	<i>N-Acetyl-Lactosamin</i>
M	<i>Metastasen</i>
MCF7	<i>eine Luminal A-like Mammakarzinomzelllinie</i>
MUC1	<i>Mucin-1</i>
N	<i>Nodus, Lymphknoten</i>
NFKB	<i>nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
p	<i>phosphoryliert</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PR	<i>Progesteronrezeptor</i>
proliferator-activated receptor γ	<i>proliferator-activated receptor-γ</i>
Siglec	<i>Sialinsäure-bindendes Lektin</i>
SK-BR3	<i>eine HER2-positive Mammakarzinomzelllinie</i>
T	<i>Tumorgroße</i>
T-47D	<i>eine Luminal A-like Mammakarzinom-Zelllinie</i>
TAM	<i>Tumor-assoziierte Makrophagen</i>
TA-MUC1	<i>tumor-assoziiertes Mucin 1</i>
TIM3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TNBC	<i>Triple-negatives Mammakarzinom</i>

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Er hat diese Arbeit durch seine große Erfahrung und seinen stets hilfsbereiten Einsatz maßgeblich unterstützt.

Herrn Prof. Dr. med. Sven Mahner, Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck, Frau PD Dr. med. Rachel Würstlein und Frau Prof. Dr. med. Nina Ditsch danke ich für die hervorragende klinische Betreuung und wissenschaftliche Förderung.

Ebenso danke ich den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LMU Klinikums, insbesondere Frau Martina Rahmeh und Frau Christina Kuhn, für die großartige Zusammenarbeit. Allen Doktorand*innen danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei ihren Forschungsprojekten und für die Geduld mit meinen teils kleinteiligen Anmerkungen.

Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern, insbesondere bei Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr und Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel vom Pathologischen Institut der LMU München für die zahlreichen gemeinsamen Projekte. Frau Prof. Mayr danke ich zudem für die Übernahme des Fachmentorats.

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LMU Klinikums für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, für die konstruktiven und auch lustigen Momente im klinischen Alltag.

Mein großer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, meinem Mann, meiner Tochter, meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung in jeder Lebenslage, für die vielen fröhlichen Augenblicke, für ein immerwährend offenes Ohr und ihre Gedanken und Ideen zu meinen Sorgen und Nöten.

9. Anhang – Verzeichnis der habilitationsrelevanten Fachpublikationen

Die in dieser Arbeit diskutierten Fachpublikationen sind im Folgenden in der Reihenfolge ihres Erscheinens in dieser Zusammenfassung der kumulativen Habilitationsleistung aufgeführt und im Anschluss abgedruckt.

Semmlinger, A., von Schoenfeldt, V., Wolf, V., Meuter, A., Kolben, T. M., Kolben, T., Zeder-Goess, C., Weis, F., Gallwas, J., Wuerstlein, R., Hermelink, K., Schmoeckel, E., Harbeck, N., Mayr, D., Mahner, S., Jeschke, U., & Ditsch, N. (2018).

EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer.

BMC cancer, 18(1), 431. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4286-9>

Hester, A., Ritzer, M., Kuhn, C., Schmoeckel, E., Mayr, D., Kolben, T., Dannecker, C., Mahner, S., Jeschke, U., & Kolben, T. M. (2019).

The role of EP3-receptor expression in cervical dysplasia.

Journal of cancer research and clinical oncology, 145(2), 313–319. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2785-3>

Czogalla, B., Kuhn, C., Heublein, S., Schmoeckel, E., Mayr, D., Kolben, T., Trillsch, F., Burges, A., Mahner, S., Jeschke, U., & **Hester, A.** (2019).

EP3 receptor is a prognostic factor in TA-MUC1-negative ovarian cancer.

Journal of cancer research and clinical oncology, 145(10), 2519–2527. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03017-8>

Hester, A.*, Salzmann, B.*, Rahmeh, M., Kolben, T., Czogalla, B., Ditsch, N., Mahner, S., Jeschke, U., & Kolben, T. M. (2019). * geteilte Erstautorenschaft

EP3 receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells.

OncoTargets and therapy, 12, 6053–6068. <https://doi.org/10.2147/OTT.S204919>

Lin, L., Kuhn, C., Ditsch, N., Kolben, T., Czogalla, B., Beyer, S., Trillsch, F., Schmoeckel, E., Mayr, D., Mahner, S., Jeschke, U., & **Hester, A.** (2021)

Breast adipose tissue macrophages (BATMs) have a stronger correlation with breast cancer survival than breast tumor stroma macrophages (BTSMs).

Breast cancer research: BCR, 23(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01422-x>

Trebo, A., Ditsch, N., Kuhn, C., Heidegger, H. H., Zeder-Goess, C., Kolben, T., Czogalla, B., Schmoeckel, E., Mahner, S., Jeschke, U., & **Hester, A.** (2020).

High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients.

Cancers, 12(4), 953. <https://doi.org/10.3390/cancers12040953>

Trebo, A., Ditsch, N., Degenhardt, T., Kuhn, C., Rahmeh, M., Schmoeckel, E., Mayr, D., Czogalla, B., Kolben, T., Meister, S., Mahner, S., Jeschke, U., & **Hester, A.** (2021).

First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer.

International journal of molecular sciences, 22(4), 2000. <https://doi.org/10.3390/ijms22042000>