

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinik der Universität München

Direktor:
Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Evaluation ausgewählter
Galectine als prognostische Faktoren im
Ovarialkarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heiko René Schulz

aus Leonberg

2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Julia Jückstock
Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Doris Mayr
Prof. Dr. med. Nina Ditsch

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2022

1. Eidesstattliche Versicherung

Schulz, Heiko

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Evaluation ausgewählter Galectine als prognostische Faktoren im Ovarialkarzinom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.12.2022

Ort, Datum

Heiko Schulz

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

2. Inhaltsverzeichnis

1. Eidesstattliche Versicherung.....	2
2. Inhaltsverzeichnis.....	3
3. Abkürzungsverzeichnis.....	5
4. Publikationsliste	7
4.1 Veröffentlichung I	7
4.2 Veröffentlichung II.....	7
5. Beitrag zu den Veröffentlichungen.....	7
5.1 Beitrag zu Veröffentlichung I.....	7
5.2 Beitrag zu Veröffentlichung II	7
6. Einleitung	8
6.1. Das Ovarialkarzinom.....	8
6.1.1. Epidemiologie	8
6.1.2. Klinische Eigenschaften.....	8
6.1.3. Pathologische Eigenschaften.....	9
6.1.4. Prognostische Faktoren.....	10
6.2. Galectine	11
6.2.1. Biochemische Eigenschaften	11
6.2.2. Tumorbioologische Eigenschaften	12
6.2.3. Ausgewählte Galectine	14
6.2.4. Therapeutische Anwendung.....	16
6.3. Ziel der Studie.....	17
7. Zusammenfassung	18
7.1. Galectin-1	19
7.2. Galectin-3.....	20
7.3. Galectin-7	21
7.4. Galectin-8.....	22
7.5. Galectin-9.....	22
7.6. Fazit	24
8. Abstract.....	25
9. Summary.....	25
9.1. Galectin-1.....	25

2. Inhaltsverzeichnis

9.2. Galectin-3.....	26
9.3. Galectin-7.....	27
9.4. Galectin-8.....	28
9.5. Galectin-9.....	28
9.6. Conclusion.....	30
10. Veröffentlichung I.....	31
11. Veröffentlichung II.....	31
12. Literaturverzeichnis.....	32
13. Danksagung.....	38

3. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
B7-H1	B7 homolog 1, ehemals verwendete Bezeichnung für PD-L1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMI	Body-Mass-Index
BRCA1	Breast Cancer Gene 1
BRCA2	Breast Cancer Gene 2
Ca	Karzinom/ Carcinoma
CA-125	Cancer-Antigen 125
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CRD	carbohydrate-binding site
CT	Computertomographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
Gal	Galectin
GRIFIN	Galectin-Related Inter-Fiber Protein
HGSOC	High-grade serous ovarian cancer
IF	Immunfluoreszenz/ Immunofluorescence
IHC	Immunhistochemie/ Immunohistochemistry
LGSOC	Low-grade serous ovarian cancer
Mac-2	Ehemals verwendete Bezeichnung für Galectin-3
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
OvCa	Ovarialkarzinom/ ovarian cancer
OVGAL11	Name eines Galectin-ähnlichen Proteins
OS	Gesamtüberleben/ Overall Survival

p53	Name eines Tumorsuppressor-Proteins
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progressionsfreies Überleben/ Progression-free Survival
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
STICs	Serous tubal intraepithelial carcinoma
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen/ Tumor-Associated Macrophages
T _c	Zytotoxische T-Zelle/ cytotoxic T-cell
T _{H1}	T-Helfer Zelle Typ 1/ T-Helper cell Type 1
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TMA	Tissue micro array
TNM	Stadieneinteilung maligner Tumoren
TP53	Gen des p53-Proteins
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle/ regulatory T-cell
USA	Vereinigte Staaten von Amerika/ United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Zusammengesetzt: <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i> , Name eines Signalproteins im gleichnamigen Signalweg

4. Publikationsliste

4.1 Veröffentlichung I

Schulz, H.; Schmoeckel, E.; Kuhn, C.; Hofmann, S.; Mayr, D.; Mahner, S.; Jeschke, U. Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1230.

4.2 Veröffentlichung II

Schulz, H.; Kuhn, C.; Hofmann, S.; Mayr, D.; Mahner, S.; Jeschke, U.; Schmoeckel, E. Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 323.

5. Beitrag zu den Veröffentlichungen

5.1 Beitrag zu Veröffentlichung I

Bei dieser Arbeit habe ich nach bereits vorhandenen Vorarbeiten die histologische Auswertung der Galectin-1, -3 und -7 Färbung weitergeführt. Die anschließende statistische Auswertung, die Erstellung der Abbildungen und das Verfassen der Veröffentlichung wurden von mir durchgeführt.

5.2 Beitrag zu Veröffentlichung II

Für diese Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen für Galectin-8 und -9 von mir selbst durchgeführt und ausgewertet. Die anschließende statistische Auswertung, die Erstellung der Abbildungen und das Verfassen der Veröffentlichung wurden von mir durchgeführt.

6. Einleitung

6.1. Das Ovarialkarzinom

6.1.1. Epidemiologie

Malignomerkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den USA dar [1]. Wird nach Alter und Geschlecht differenziert, so machen Malignomerkrankungen in der Gruppe der 40- bis 79-jährigen Frauen die häufigste Todesursache aus [1]. Das Ovarialkarzinom (OvCa) ist dabei bei Frauen insgesamt für 5% aller Todesfälle durch Malignomerkrankungen ursächlich und liegt damit hinter dem Lungenkarzinom, dem Mammakarzinom, dem kolorektalen Karzinom und dem Pankreaskarzinom an fünfter Stelle [1]. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte konnte eine nur leichte Abnahme der Inzidenz verzeichnet werden, die sich am ehesten auf eine vermehrte Einnahme von oralen Kontrazeptiva zurückführen lässt [2, 3]. Das mediane Alter bei Diagnosestellung ist 63 Jahre, und der überwiegende Teil der Patientinnen fällt in die Altersgruppe der 55- bis 64- Jährigen, wobei das OvCa jedoch in jedem Alter auftreten kann. So sind 12% der Patientinnen bei Diagnosestellung nicht älter als 44 Jahre [2]. Die Überlebensrate der Erkrankung stieg im Verlauf der letzten Jahre nur leicht und bleibt weiterhin bei knapp unter 50% [1, 2].

6.1.2. Klinische Eigenschaften

Mehrere Risikofaktoren für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms sind beschrieben [4-7]. Ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung besteht bei einer familiären bzw. genetischen Prädisposition, beispielsweise bei Vorliegen einer Keimbahn-Mutation in den Breast Cancer Genen 1 oder 2 (BRCA1/2) oder eines Lynch-Syndroms [8, 9]. Weitere Risikofaktoren sind ein hohes Lebensalter, eine Vorerkrankung mit Endometriose, ein niedriger sozioökonomischer Status oder eine Hormontherapie in der Peri- und Postmenopause oder ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) [4-7]. Schwangerschaften, Stillen und die Verwendung oraler Kontrazeption stellen hingegen protektive Faktoren dar [5-7].

Bislang gibt es keine gängigen Methoden zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen in der Gesamtpopulation. Versuche des Screenings mittels einer Messung des Tumormarkers CA-125 im Blut und transvaginalen Ultraschalluntersuchungen konnten beispielsweise keine Verbesserung des Gesamtüberlebens zeigen [10]. Das OvCa bleibt zu Beginn der Erkrankung häufig symptomlos, und eventuell vorlie-

gende frühe Symptome wie Völlegefühl, Blähungen, abdominelle Schmerzen oder eine Zunahme der Miktionsfrequenz sind unspezifisch [7].

Diagnostische Maßnahmen umfassen zunächst eine gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung und einen transvaginalen Ultraschall [7]. Zur weiteren spezifischeren Abklärung können unter Umständen eine Computertomographische (CT), eine Magnetresonanztomographische (MRT) und eine Positronen-Emissionstomographische (PET/CT) Untersuchung hinzugezogen werden, wobei diese Untersuchungen ein operatives Staging nicht ersetzen können [7]. Die definitive Diagnosestellung erfolgt in der Regel durch eine histologische Untersuchung [7].

Die leitliniengerechte Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms umfasst eine makroskopisch vollständige Tumoresektion gefolgt von einer platinhaltigen Chemotherapie [7]. Die erste zielgerichtete Therapieoption konnte mit dem gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF gerichteten Antikörper Bevacizumab ergänzend in der Ersttherapie oder in der Rezidivtherapie etabliert werden [7, 11, 12]. Mit den Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP) konnte noch eine weitere zielgerichtete Therapieoption bereits in die Rezidiv- und Erhaltungstherapie des Ovarialkarzinoms integriert werden [7, 13-19]. Mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren und insbesondere den PD-1/PD-L1 Inhibitoren bietet sich eine neue vielversprechende Gruppe von Therapeutika im OvCa, die bislang jedoch hauptsächlich im Rahmen von Studien angewendet wird [20, 21]. Die Bindung des beispielsweise auf Tumorzellen exprimierten PD-L1 (Synonym: B7-H1) an das zum Beispiel auf Immunzellen exprimierte PD-1 verhindert eine adäquate Immunantwort auf Karzinomzellen und lässt den Tumor damit dem Immunsystem entkommen [22, 23]. Eine Inhibition dieses Mechanismus stellt dabei in der Theorie eine ausreichende Immunantwort des Organismus auf den Tumor wieder her; die bisherigen Studienergebnisse blieben jedoch überwiegend hinter den hohen Erwartungen zurück [21].

6.1.3. Pathologische Eigenschaften

Die fünf größten histologischen Subgruppen des Ovarialkarzinoms sind high-grade seröse Ovarialkarzinome (HGSOC), low-grade seröse Ovarialkarzinome (LGSOC), endometrioides Ovarialkarzinome, klarzellige Ovarialkarzinome und muzinöse Ovarialkarzinome [7, 24, 25]. Die überwiegende Mehrheit der Fälle stellen dabei die high-grade serösen Ovarialkarzinome [7, 26].

Nach vorangehendem TNM-Staging werden Ovarialkarzinome nach der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Klassifikation in 4 Gruppen unterteilt: Stadium I umfasst Fälle mit Begrenzung auf Ovarien oder die Eileiter,

Stadium II solche mit zusätzlicher Ausbreitung auf Uterus oder andere pelvine intraperitoneale Organe, Stadium III beschreibt Fälle mit darüberhinausgehender Tumorausdehnung in das Peritoneum jenseits des Beckens und/oder Metastasen in retroperitonealen Lymphknoten, während Fälle mit Fernmetastasen außerhalb des Peritonealraumes in das Stadium IV fallen [27]. Die meisten HGSOE Fälle präsentieren sich bei Diagnosestellung bereits im Stadium III [27].

Das Verständnis vom OvCA als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen und die Unterscheidung in LGSOE und HGSOE als zwei unabhängige Tumorentitäten mit zwei unterschiedlichen Pathogenesewegen stellten eine der zentralen Entdeckungen zur Pathogenese des OvCa der letzten Jahre dar. So entsteht HGSOE höchstwahrscheinlich nicht direkt im Ovar, sondern eher aus Vorläuferläsionen in den Eileitern wie beispielsweise den sogenannten „serous tubal intraepithelial carcinomas“ (STICs), die mit HGSOE gemeinsame Mutationen, beispielsweise in den Genen TP53, BRCA1/2 oder PTEN, teilen [28].

6.1.4. Prognostische Faktoren

Messgrößen, die mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines bestimmten Ereignisses in einem Kollektiv von Erkrankten einer bestimmten Erkrankung korrelieren, werden prognostische Faktoren genannt [29]. Mögliche Ereignisse können dabei das Eintreten eines Todesereignisses oder das Auftreten eines Krankheitsrezidivs sein. Man unterscheidet das Gesamtüberleben/Overall Survival (OS), bei dem lediglich das Eintreten eines Todesereignisses betrachtet wird, und das progressionsfreie Überleben/Progression-free Survival (PFS), bei dem neben dem Eintreten eines Todesereignisses auch das Auftreten eines Krankheitsrezidivs betrachtet wird [30].

Als prognostische Faktoren einer Malignomerkrankung kommen klinische oder histopathologische Faktoren in Frage. Bekannte prognostische Faktoren im OvCa sind beispielsweise das Lebensalter der Patientinnen bei Diagnosestellung, ein hohes FIGO-Stadium, das Vorliegen eines muzinösen Subtyps, das Vorliegen eines Residualtumors nach operativer Therapie oder große Mengen von Aszites [31-34].

Von besonderem Interesse sind jedoch molekulare prognostische Faktoren wie beispielsweise von Tumorzellen exprimierte Proteine. Die Identifikation solcher Proteine mit prognostischen Eigenschaften stellt auch gleichzeitig eine Möglichkeit dar, diagnostische und vor allem therapeutisch nutzbare Tumorproteine zu identifizieren. Der BRCA-Mutationsstatus stellt einen bekannten molekularen prognostischen Faktor im OvCa dar. So zeigen Patientinnen mit BRCA-mutiertem OvCa ein

besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu BRCA-Wildtyp-Fällen [31]. Obwohl zahlreiche weitere Biomarker im OvCa beschrieben wurden, konnten sich davon bislang keine in der Praxis als prognostische Marker etablieren oder auf deren Grundlage weitere zielgerichtete Therapien erfolgreich entwickelt werden [33].

6.2. Galectine

Im Jahr 1994 wurden Galectine als eigene Proteinfamilie mit den zu dieser Zeit bekannten Vertretern Galectin (Gal)-1, -2, -3, -4 erstbeschrieben [35, 36]. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden anhand zweier wesentlicher Eigenschaften definiert: Eine Bindungsaffinität für β -Galactoside und eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der sogenannten „carbohydrate-binding site“ (CRD) [35, 36].

Seither wurden zahlreiche weitere Galectine im Menschen und anderen Spezies entdeckt. Die Beantwortung der Frage, wie viele verschiedene Galectine existieren, gestaltet sich jedoch, wie im Folgenden dargestellt, überraschend kompliziert. So muss diese Frage schon unterschiedlich beantwortet werden, betrachtet man humane Galectine allein oder auch Galectine in anderen Spezies. Im Jahr 2004 umfasste die Galectin-Familie die Vertreter Gal-1 bis -10 und Gal-12 bis -14, wobei Gal-5 in Ratten und Gal-6 in Mäusen, beide aber nicht im Menschen vorkommen [37]. Der Terminus Gal-11 wurde zunächst für zwei verschiedene Proteine verwendet (OVGAL11 und GRIFIN) [38-40], von denen jedoch bei genauerer Betrachtung keines die Kriterien eines Galectins erfüllte [37]. Dessen ungeachtet wurde für OVGAL11 auch gleichzeitig fälschlicherweise der Terminus Galectin-15 vergeben [41]. Zuletzt charakterisiert wurde Gal-16 [42]. Im Menschen ist heute das Vorkommen der Galectine-1 bis -4, -7 bis -10, -12 bis -14 und -16 bekannt [43, 44].

6.2.1. Biochemische Eigenschaften

Anhand der CRD können Galectine in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: Prototype-Galectine (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 und -16) bestehen aus einer CRD und bilden häufig Homodimere. Tandem repeat-Galectine (Gal-4, -6, -8, -9 und -12) besitzen zwei unterschiedliche, mittels einer Aminosäurekette, der sogenannten linker chain, verbundene CRDs. Chimäre Galectine mit ihrem bisher einzigen Vertreter Gal-3 besitzen neben der CRD eine weitere nicht-kohlenhydratbindende N-terminale Proteindomäne und bilden häufig Oligomere (Figure 1) [36, 37, 42, 45-48].

Gemeinsam ist allen Galectinen eine Bindungsaffinität für β -Galactoside, vorrangig in Form proteingebundener Glycoproteine oder Proteoglycane auf der Zelloberfläche

oder in der Extrazellulärmatrix [37, 46]. Durch mehrere dieser Bindungen kann eine komplexe Gitterstruktur entstehen, das sogenannte „lattice“, das wiederum durch Clustern von Proteinen auf komplexe Weise in verschiedene Signalwege einwirken kann [49]. Die unterschiedlichen CRDs der verschiedenen Galectine besitzen dabei unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Proteoglycane oder Glycoproteine [46]. Galectine besitzen keine klassischen Signalsequenzen und werden an freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert [37, 46, 48, 50]. Gleichwohl ist ihr Vorkommen im Zellkern, auf der Plasmamembran und im Extrazellularraum beschrieben [37, 46]. Letzteres erfolgt durch einen noch nicht vollständig verstandenen sogenannten nicht-klassischen Sekretionsweg [37, 46, 51, 52]. Physiologisch wirken Galectine extrazellulär, vorrangig über Galectin-Glycan-Bindungen auf Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, aber auch intrazellulär über Galectin-Protein-Interaktionen an Signalwegen [46, 53]. Sie spielen dabei eine große Rolle in zahlreichen Bereichen, beispielsweise in Wachstum und Entwicklung, in der Regulation des Zell-Zyklus und der Apoptose, der Immunregulierung, bei Infektionen und entzündlichen Prozessen sowie auch in der Tumorbologie [46, 48, 52, 54-58].

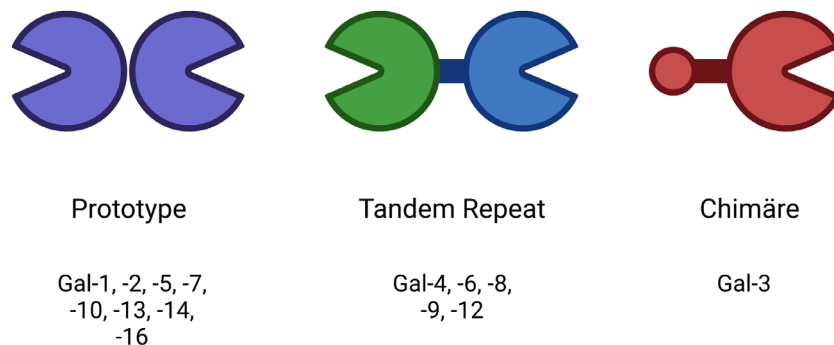


Figure 1. Es werden drei verschiedene Gruppen von Galectinen unterschieden: Prototype-Galectine, tandem repeat-Galectine und chimäre Galectine. In Anlehnung an [36, 37, 45, 46]. Created with BioRender.com.

6.2.2. Tumorbologische Eigenschaften

Zahlreiche Tumorarten weisen eine differentielle Expression oder einen Wechsel der subzellulären Lokalisation von Galectinen im Vergleich zum Normalgewebe auf [46, 55, 59]. Darüber hinaus konnte ein – teils hemmender, teils fördernder – Einfluss von Galectinen in vielen verschiedenen tumorbologischen Prozessen nachgewiesen werden [45, 55]. Darunter fallen auch alle von Hanahan und Weinberg als sogenannte „Hallmarks of cancer“ [60] bezeichneten zentralen tumorbologischen Prozesse: die Aufrechterhaltung von Proliferationssignalen und das Ausweichen wachstumshemmender Signale, das Verhindern von Zelltod, die Induktion von Gefäßneubil-

dung, invasives Wachstum und Metastasierung, das Erreichen replikativer Immortalität, genetische Instabilität und Mutationen, das Verhindern von immungesteuerter Zerstörung, das Begünstigen einer tumorfördernden Inflammation sowie die Deregulation des Zellmetabolismus [61, 62] (Figure 2). Der Einfluss von Galectinen konnte dabei in zahlreichen Tumorentitäten gezeigt werden wie beispielweise dem Mamma-, Cervix-, Colon-, Magen-, Lungen oder Prostata-Ca [45]. In verschiedenen Karzinomen zeigten Galectine dabei auch eine prognostische Relevanz [45, 63-67].

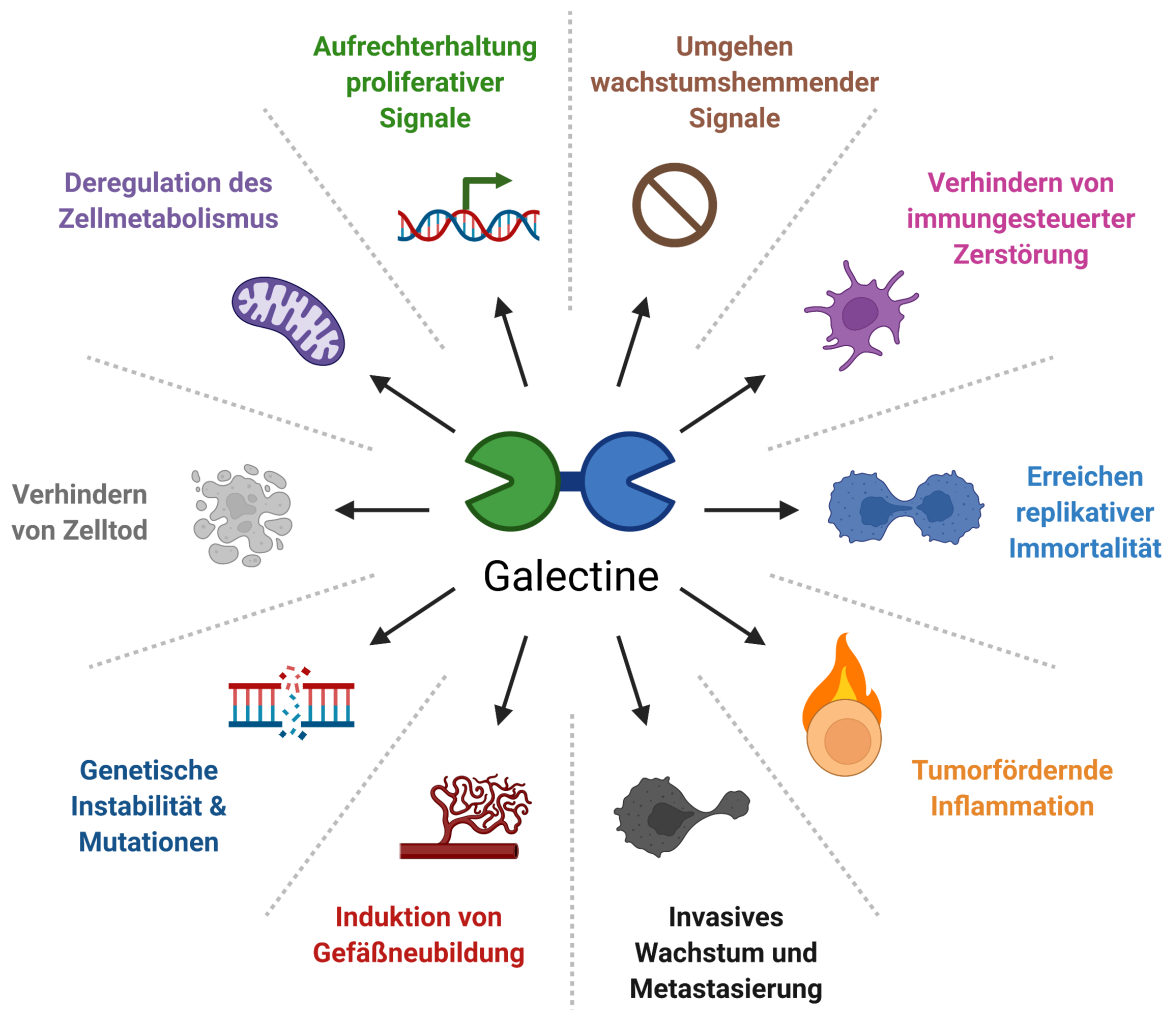


Figure 2. Galectine spielen in vielen verschiedenen tumorbiologischen Prozessen eine Rolle. Darunter auch die von Hanahan und Weinberg als sogenannte „Hallmarks of cancer“ bezeichneten Prozesse. In Anlehnung an [60, 62]. Created with BioRender.com.

6.2.3. Ausgewählte Galectine

6.2.3.1 *Galectin-1*

Gal-1 wurde 1975 erstmals beschrieben und damals aufgrund seiner Entdeckung im Zitteraal zunächst Electrolectin genannt [46]. In humanen OvCa-Zellen wurde das Vorkommen von Gal-1 bereits 1990, damals jedoch noch unter dem Namen Galeptin, beschrieben [68], noch bevor es 1994 als erster Vertreter der Galectin Familie in Galectin-1 umgetauft wurde [36]. Bereits hier war bekannt, dass Gal-1 ebenfalls auch in der extrazellulären Matrix vorkommen kann und dabei offenbar von Bedeutung für die Tumorzelladhäsion an extrazelluläre Matrix ist [68, 69]. Gleichwohl wurde erst im Jahr 2012 erstmals die prognostische Bedeutung von Gal-1 im OvCa beschrieben [70]. Es wurde gezeigt, dass Fälle mit hoher Gal-1 Expression im peritumoralen Stroma ein geringeres progressionsfreies Überleben (PFS) aufweisen als Fälle mit geringer peritumoraler Gal-1 Expression [70]. Gleichzeitig wurde an dieser Stelle erneut die Bedeutung von Gal-1 in der Tumorumgebung deutlich, da das Gal-1-Vorkommen hier im peritumoralen Stroma evaluiert wurde [70]. Eine Analyse des Gesamtüberlebens (OS) wurde dabei jedoch nicht durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie die Gal-1 Expression in den Tumorzellen selbst ausgewertet [71]. Fälle mit hoher Gal-1 Expression im Tumor zeigten ein reduziertes PFS und OS im Vergleich zu Fällen mit geringer Gal-1 Expression [71]. Da sich jedoch beide Studien auf die Auswertung jeweils nur einer Lokalisation beschränkten, bleibt die Frage offen, ob eine Korrelation der Gal-1 Expression in Tumor und peritumoralem Stroma besteht.

6.2.3.2 *Galectin-3*

Bereits 1991 konnte aus Brustkarzinomgewebe cDNA eines Galactosid-bindenden Proteins nachgewiesen werden, das später Galectin-3 benannt wurde [36, 72]. Im OvCa konnte Gal-3, damals noch unter der Bezeichnung „Laminin-binding protein“ erstmals 1994 nachgewiesen werden [73]. Ebenso konnte eine verminderte Expression von Gal-3 in OvCa-Zellen im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt werden; die subzelluläre Lokalisation von Gal-3 wurde jedoch nicht näher beschrieben [73]. Im Endometrium-Ca konnte Gal-3 immunhistochemisch im Nucleus und dem Zytoplasma festgestellt werden [74]. Fälle mit ausschließlich zytoplasmatischer Gal-3 Expression zeigten ein erhöhtes invasives Verhalten im Vergleich zu Fällen mit kernständiger und zytoplasmatischer Gal-3 Expression [74]. Eine ähnliche Beobachtung konnte später von Brustmann auch im OvCa getätigt werden. Hier zeigten Fälle mit ausschließlich zytoplasmatischer und fehlender kernständiger Gal-3 Expression eine schlechtere Prognose, während die zytoplasmatische Gal-3 Expression selbst

keinen Einfluss auf das Überleben hatte [75]. Im Gegensatz dazu zeigten Kim et al. in ihrer Studie, dass Patientinnen mit hoher zytoplasmatischer Gal-3 Expression ein schlechteres PFS aufwiesen, während kernständige Gal-3 Expression offenbar nicht beobachtet wurde [76].

6.2.3.3 Galectin-7

Erstmals wurde 1995 das Vorkommen von humanem Galectin-7 in der Epidermis beschrieben [77, 78]. In Zusammenhang mit dem OvCa wurde Galectin-7 erstmals 2013 von Kim et al. untersucht [79]. Gal-7 konnte hier immunhistochemisch im Zytoplasma und Nucleus von Tumorzellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte dargelegt werden, dass Fälle mit hohen Gal-7 Expressionen ein reduziertes OS zeigen [79]. In einem Zellkulturexperiment konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass ein Gal-7-Knockdown die Tumorzell-Proliferation senkt [79]. In einer Studie von Labrie et al. konnte Gal-7 ebenfalls in OvCa-Gewebe nachgewiesen werden [80]. Die subzelluläre Lokalisation wurde hier überwiegend im Zytoplasma angegeben, wobei auch eine Sekretion in das Interstitium beobachtet wurde [80]. Zusätzlich konnte die Studie in Zellkulturexperimenten zeigen, dass Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 die Expression von Gal-7 induzieren und Gal-7 zum einen das invasive Verhalten von OvCa-Zellen fördert, zum anderen in Lymphozyten und Monozyten Apoptose induziert [80].

6.2.3.4 Galectin-8

Galectin-8 wurde erstmals 1995 als neues Galectin vom tandem-repeat Typ beschrieben [81]. Für Galectin-8 wurden mindestens sieben verschiedene mRNAs beschrieben, die durch Splicing entstehen und für verschiedene Unterformen von Gal-8 kodieren, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden können [46]. Bereits 2001 wurde das Vorkommen von Gal-8 mRNA in zwei OvCa-Zelllinien beschrieben [82]. Erst 2017 wurde Gal-8 auch in OvCa-Gewebe mittels Immunfluoreszenz (IF) auf Proteinebene nachgewiesen [83]. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen Gal-8 Expression und dem Erwerb einer Chemoresistenz, nicht jedoch bezüglich des Überlebens, beobachtet werden [83]. Mittels ELISA gemessene höhere Gal-8 Konzentrationen im Plasma von OvCa-Patientinnen korrelierten jedoch mit einem schlechteren Überleben (OS und PFS) [83].

6.2.3.5 *Galectin-9*

Das Vorkommen von Galectin-9 in murinem Gewebe wurde erstmals 1997 beschrieben [84, 85]. Im Menschen existieren zwei Gene für Gal-9 sowie mindestens drei verschiedene Isoformen des Proteins mit unterschiedlicher Länge der linker chain [46]. Ähnlich wie zu Gal-8 liegen nur wenige Studien vor, die die Bedeutung von Gal-9 im OvCa untersuchen. Auch Gal-9 konnte in einer OvCa-Zelllinie nachgewiesen werden [82]. Labrie et al. evaluierten Gal-9 als prognostischen Marker im OvCa [83]. Sie beobachteten die mittels IF untersuchte Gal-9 Expression in Form von zytoplasmatischer und in Form von perinucleärer punktförmiger Anfärbbarkeit. Diese spezielle Form der Gal-9 Expression stellte sich in der Studie als negativer prognostischer Faktor hinsichtlich des Gesamtüberlebens heraus [83]. Als wichtiger Bindungspartner für Gal-9 konnte Tim-3 identifiziert werden, dass auf T-Lymphozyten exprimiert wird, und durch die Interaktion mit Gal-9 die Apoptose der Immunzelle einleiten und so die Immunantwort herunterregulieren kann [86, 87]. Hinweise, dass diese Mechanismen auch für die Entwicklung und Progress einer OvCa-Erkrankung relevant sind, zeigen die erhöhte Tim-3 Expression von T-Zellen in OvCa-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Vergleichspatientinnen sowie die erhöhte Tim-3 Expression der T-Lymphozyten bei fortgeschrittenen FIGO-Stadien im Vergleich zu frühen FIGO-Stadien [88]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Gal-9 und PD-1 eine Bindung eingehen können, die weder durch PD-L1 noch durch die gängigen therapeutischen PD-1 Antikörper, wie beispielsweise Pembrolizumab gehemmt wird [89]. Durch simultane Bindung von Gal-9 an Tim-3 und PD-1 können so Komplexe entstehen, die die Interaktion von Gal-9 und Tim-3 und damit die Induktion von Apoptose in PD-1+ Tim-3+ T-Zellen wiederum dämpfen [89]. Gal-9 stellt damit einen wichtigen Faktor tumorimmunologischer Signalwege dar, der durch Inhibierung wiederum therapeutisch genutzt werden könnte [89].

6.2.4. **Therapeutische Anwendung**

Die große Hoffnung der Biomarker-basierten Forschung liegt darin, aus einer potenziellen diagnostischen Nutzbarkeit auch gleichzeitig eine therapeutische Nutzung ableiten zu können. Therapeutika für diese sogenannten „targeted-therapies“ können beispielsweise kleine organische Moleküle wie die PARP-Inhibitoren darstellen oder aus der Gruppe monoklonaler Antikörper wie der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab stammen [20].

Für Gal-1 wurden bereits mehrere mögliche Inhibitoren untersucht [90]. Das synthetische Disaccharid Thiodigalactosid bindet Gal-1 und ist bei intratumoraler Administration in der Lage, das Tumorwachstum zu reduzieren, Immunzelleinwanderung

zu erhöhen und Angiogenese zu reduzieren [91]. Ein weiterer Hemmstoff mit dem Namen „Anginex“ wurde zunächst als anti-angiogenetisch wirkendes Peptid entwickelt [92]. Später konnte die Wirkweise über Gal-1 demonstriert werden, da in Gal-1-defizienten Mäusen die Wirkung von Anginex aufgehoben wurde [93]. Nach dem Vorbild von Anginex wurden daraufhin Nicht-Peptid-Moleküle mit anti-angiogenetischen Eigenschaften entwickelt [94]. Darunter fand sich auch „OTX008“, das Gal-1 bindet und nicht-kompetitiv die Galectin-Galactosid-Bindung hemmt [95]. Durch „OTX008“ konnten damit eine Hemmung von Zellproliferation und Zellinvasion in Zellkultur-Experimenten sowie eine Verminderung von Tumorwachstum und Angiogenese in einem Mausmodell erreicht werden [95, 96]. Für Galectin-3 sind ebenfalls mehrere Hemmstoffe bekannt [90], darunter beispielsweise auch „PectaSol-C modifiziertes Zitrus Pectin“, das in Zellkulturexperimenten mit einer OvCa-Zelllinie in der Lage war, die Zellen für Paclitaxel zu sensibilisieren [97]. Auch für Gal-7 konnte bereits ein peptidischer Inhibitor entwickelt werden, der in der Lage ist, die Dimerisierung von Gal-7 zu verhindern und auch funktionell Gal-7 in der Induktion von Apoptose einer T-Zelllinie zu inhibieren [98].

In Zukunft lassen sich wohl noch zahlreiche weitere Studien zu neuen Therapeutika mit Angriffspunkten an Galectinen erwarten. Grundlage für deren Entwicklung ist dabei stets auch eine genaue Analyse der prognostischen Bedeutung des jeweiligen Zielproteins innerhalb der jeweiligen Erkrankung.

6.3. Ziel der Studie

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die schlechte Prognose eines Ovarialkarzinoms im Wesentlichen durch die späte Diagnosestellung in fortgeschrittenen Tumorstadien und die wenigen und überwiegend unspezifischen Therapieoptionen bestimmt wird. Die Identifikation von Tumorproteinen als prognostische Faktoren stellt dabei gleichzeitig eine Möglichkeit dar, diagnostisch oder therapeutisch nutzbare Tumorproteine zu identifizieren. Galectine als Proteinfamilie konnten bereits in verschiedenen Karzinomerkrankungen und teilweise auch bereits im OvCa als prognostische Faktoren identifiziert werden [45, 63-67]. Für einige Galectine wurden bereits mögliche Therapeutika untersucht [90]. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener Galectine hinsichtlich ihrer prognostischen Eigenschaften im OvCa. Dafür wurden nach vorheriger Literaturrecherche die Galectine-1, -3, -7, -8 und -9 ausgewählt. Im Gegensatz zu einigen bisherigen Studien wurde bei der Auswertung ein besonderer Wert auf die gesonderte Beurteilung der Galectin-Expressionen in unterschiedlichen (sub-)zellulären Lokalisationen gelegt.

7. Zusammenfassung

Die beiden in Kapitel 4 aufgeführten wissenschaftlichen Arbeiten evaluieren die prognostischen Eigenschaften der ausgewählten Galectine -1, -3, -7, -8 und -9 im OvCa und bieten damit eine Grundlage für weitergehende Studien hinsichtlich diagnostischer und therapeutischer Nutzbarkeit dieser Proteine. Die verschiedenen Galectin-Expressionen wurden dafür mittels Immunhistochemie (IHC) an histologischen Schnitten aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebe durchgeführt. Hierbei wurden entweder Flächenschnitte (Gal-1, -3, -7) oder Schnitte eines eigens dafür angefertigten Tissue Micro Arrays (TMA) (Gal-8, -9) verwendet. Die Färbeintensität wurde lichtmikroskopisch bestimmt und daraufhin mit vorliegenden klinischen und pathologischen Parametern sowie mit Überlebensdaten des Kollektivs korreliert (Figure 3).

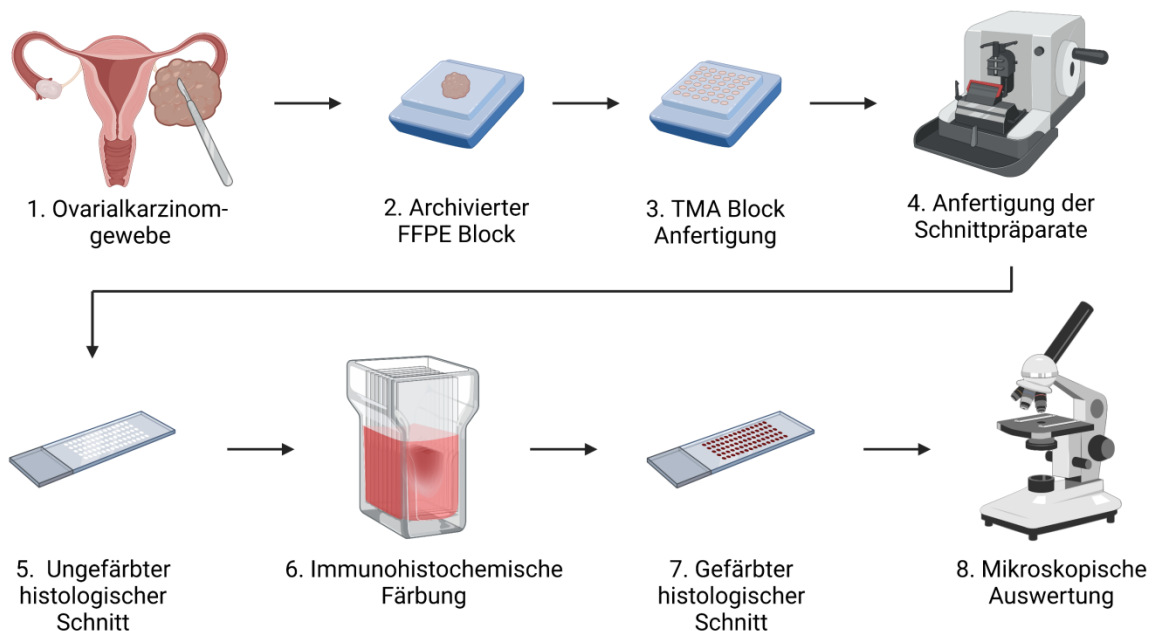


Figure 3. Operationspräparate von Ovarialkarzinomen (1) wurden zur Routinediagnostik aufgearbeitet und daraus Gewebeprobe(n) archiviert (2). Aus archiviertem Gewebe wurden zunächst TMA-Blöcke (3) und daraufhin histologische Schnitte angefertigt (4). Die Gal-1-, Gal-3- und Gal-7-Färbungen wurden unmittelbar an histologischen Leerschnitten der archivierten FFPE Blöcke durchgeführt (hier entfällt Schritt 3). Die jeweiligen Leerschnitte (5) wurden immunhistochemisch gefärbt (6). Die so gefärbten Schnitte (7) wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Created with BioRender.com.

7.1. Galectin-1

In einer Studie von Kim et al. wurde gezeigt, dass Patientinnen mit starker peritumoraler Gal-1 Expression eine schlechtere Prognose aufweisen [70]. Im Gegensatz dazu wurde von Chen et al. die Gal-1 Expression in den Tumorzellen selbst ausgewertet; auch hier zeigten Fälle mit hoher Gal-1 Expression ein reduziertes Überleben (PFS und OS) [71]. Im Vergleich zu den beiden vorherigen Studien, die sich auf die Beschreibung jeweils nur einer Lokalisation beschränkten, wurde in unserer Studie die Gal-1 Expression in beiden Lokalisationen – im Tumor und im peritumoralen Stroma – differentiell ausgewertet [99]. In Tumorzellen wurde weiterhin nach Expression im Zytoplasma und in Zellkernen unterschieden (Figure 4). In der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier Kurven zeigte sowohl eine hohe zytoplasmatische als auch eine hohe peritumorale Expression eine Korrelation mit einem schlechteren OS [99]. In der multivariaten Analyse konnte sich jedoch neben dem Grading und dem FIGO-Stadium lediglich die Gal-1 Expression im Stroma als unabhängiger prognostischer Faktor behaupten [99]. Betrachtet man die Korrelationen der zytoplasmatischen Gal-1 Expression und klinischen und pathologischen Parametern, lässt sich eine Erklärung dafür erkennen. So zeigt die zytoplasmatische Gal-1 Expression eine signifikante Korrelation mit den schon bekannten prognostischen Faktoren wie dem histologischen Subtyp, dem Grading und dem FIGO-Stadium, die bei der peritumoralen Gal-1 Expression fehlen [99].

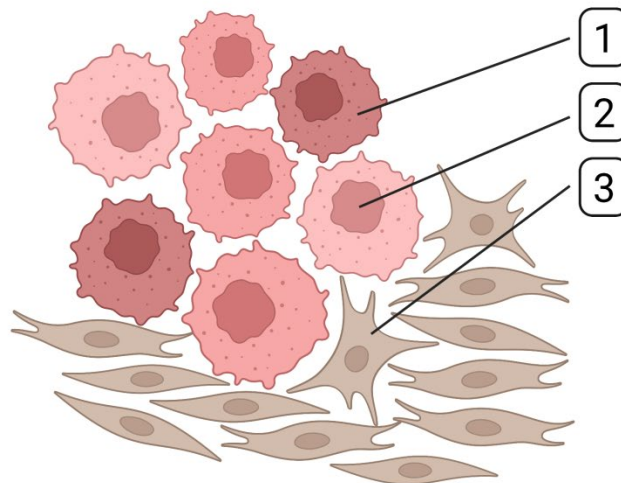


Figure 4. Galectin-1 und -3 Färbung wurde im Zytoplasma von Tumorzellen (1), im Zellkern von Tumorzellen (2) und im angrenzenden Tumorstroma getrennt ausgewertet (3). Created with BioRender.com.

Auch in anderen Tumorarten wurde von weiteren Arbeitsgruppen bereits die Expression von Gal-1 im Stroma beschrieben [100, 101]. Zudem konnte für das OvCa auch gezeigt werden, dass die im peritumoralen Stroma gemessene Gal-1 Konzentration höher liegt als die im nicht-tumorinfiltrierten Stroma [102]. Darüber hinaus konnten auch Mechanismen für die Akkumulation von Gal-1 im peritumoralen Stroma beleuchtet werden: So zeigten Fibroblasten, die mit Zellkulturmedium versetzt wurden, das zuvor durch OvCa-Zellen konditioniert wurde, eine erhöhte Gal-1 Expression, selbst wenn die OvCa-Zellen selbst nicht Gal-1 exprimierten [102].

Die von uns beobachtete positive Korrelation zwischen peritumoraler und tumoreigener zytoplasmatischer Gal-1 Expression unterstützt diese in-vitro Experimente und zeigt die gegenseitige Abhängigkeit von Gal-1 Expression in Tumor und Tumorstroma [99]. Gleichwohl bedarf es weiterer Analysen, um beispielweise Fälle mit Gal-1 negativen Tumorzellen, aber Gal-1 positivem Tumorstroma zu erklären.

Wir und andere konnten eine negative prognostische Bedeutung der Gal-1 Expression im OvCa belegen [70, 71, 99]. Gal-1 stellt daher ein vielversprechendes Zielprotein zur weiteren Evaluation von diagnostischer oder therapeutischer Nutzbarkeit dar.

7.2. Galectin-3

In einer Studie von Brustmann zeigten Fälle ohne kernständige Gal-3 Expression eine reduzierte Prognose [75]. Die zytoplasmatische Expression allein zeigte dagegen keine Korrelation mit dem Überleben [75]. Im Gegensatz dazu beobachteten Kim et al. in ihrer Studie, dass Patientinnen mit erhöhter zytoplasmatischer Gal-3 Expression ein verringertes PFS aufweisen [76].

In der von uns durchgeführten Studie zeigten Fälle mit kernständiger Gal-3 Expression in der univariaten Analyse ein besseres OS als Fälle ohne kernständige Gal-3 Expression und konnten damit das Ergebnis Brustmanns bestätigen, während die Gal-3 Expression im Zytoplasma oder im peritumoralen Stroma auch in unserer Studie keine Korrelation mit dem OS zeigte [99]. Die kernständige Gal-3 Expression wies signifikante Korrelationen mit dem histologischen Subtyp, dem Tumorstadium und dem Patientenalter auf und konnte sich daher in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger prognostischer Faktor behaupten [99].

Für Gal-3 wurden unterschiedliche Bindungspartner und unterschiedliche daraus resultierende tumorbiologische Funktionen in Zellkern und Zytoplasma beschrieben [103]. So imitiert Gal-3 im Zytoplasma beispielsweise die Funktionsweise des antiapoptischen und daher onkogenen Proteins Bcl-2 und kann so ebenfalls Apoptose verhin-

dern [104]. Im Zellkern hingegen interagiert Gal-3 mit tumorassoziierten Transkriptionsfaktoren, beispielsweise im Wnt-Signalweg [105]. Die von uns und anderen für das OvCa beobachtete verbesserte Prognose für Patientinnen mit kernständiger Gal-3 Expression in Tumorzellen lässt sich so jedoch noch nicht erklären. Aufgrund seines offenbar durch die subzelluläre Lokalisation bestimmten prognostischen Effektes und die positive prognostische Bedeutung erscheint Gal-3 als therapeutisches Target beispielsweise eines klassischen Inhibitors für das OvCa eher ungeeignet. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die die subzelluläre Lokalisation von Gal-3 in OvCa-Zellen bestimmen, könnten jedoch unter Umständen andere Angriffspunkte offenbaren, die sich eventuell im OvCa noch eher als therapeutisches Target eignen als Gal-3 selbst.

Neben dem Vorkommen von Gal-3 in Tumorzellen wurde das Vorkommen von Gal-3 schon sehr früh auch in Makrophagen, hier ursprünglich unter dem Proteinnamen Mac-2, beschrieben [106]. Sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) tragen in zahlreichen Malignomen wesentlich zum Fortschreiten der Erkrankung bei und stellen dabei auch ein potenzielles therapeutisches Target dar [107, 108]. Die Rolle Gal-3 positiver TAMs im OvCa wurde in unserer Studie jedoch nicht genauer untersucht und bleibt daher im OvCa wie auch in anderen Tumorentitäten Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

7.3. Galectin-7

Kim et al. beobachteten in ihrer Studie, dass Fälle mit hoher Gal-7 Expression ein verringertes OS aufweisen [79]. Auch in unserer Studie beobachteten wir, dass innerhalb unseres Studienkollektives Fälle mit hoher Gal-7 Expression ein schlechteres OS im Vergleich mit Fällen mit geringer Gal-7 Expression zeigten, während Fälle ohne Gal-7 Expression insgesamt das beste OS zeigen [99]. Die negative prognostische Bedeutung von Gal-7 konnte in unserem Kollektiv damit in einer Art „Dosis-abhängigen“ Art und Weise verdeutlicht werden. Der negative Einfluss von Gal-7 auf das Gesamtüberleben von OvCa-Patientinnen, wie ihn auch Kim et al. beobachtete, konnte somit bestätigt werden [79]. Wie auch in der Studie von Labrie et al. beschrieben, beobachteten wir Gal-7 jedoch überwiegend im Zytoplasma von OvCa-Zellen, seltener im Zellkern [99].

Insgesamt stellt Gal-7 damit, trotz der bislang noch wenigen Studien, die sich mit den prognostischen Eigenschaften, der molekularbiologischen Funktionen und insbesondere der Rolle im OvCa beschäftigen, ein vielversprechendes Tumorprotein für weitergehende Studien zur diagnostischen und therapeutischen Nutzbarkeit dar.

7.4. Galectin-8

Höhere Gal-8 Konzentrationen im Blutplasma von OvCa-Patientinnen korrelierten in der Studie von Labrie et al. mit einem signifikant verringerten Überleben (PFS und OS), die Expression im Tumor wies jedoch keine prognostische Bedeutung auf [83].

In unserer Studie hingegen zeigten Fälle mit hoher zytoplasmatischer Gal-8 Expression ein signifikant längeres OS als Fälle mit geringer oder fehlender Gal-8 Expression [109]. In anderen Malignomen wurden Implikationen von Gal-8 in verschiedenen tumorbiologisch relevanten Prozessen wie Zelladhäsion, Zellmigration, Apoptose, Angiogenese, Zellproliferation und Metastasierung beschrieben, vorrangig jedoch in einer krankheitsfördernden Art und Weise [110-113]. Für das OvCa im Speziellen fehlen noch derartige mechanistische Studien, die den von uns oder anderen beobachteten Einfluss auf das Überleben von OvCa-Patientinnen in die eine oder andere Richtung erklären könnten. Weiterhin fehlt es an Wissen darüber, inwiefern die verschiedenen Unterformen von Gal-8 im OvCa vorkommen oder ob sie gegebenenfalls auch unterschiedliche Funktionen ausüben. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß Antikörper-basierte Detektionsmethoden wie IHC, IF oder ELISA die verschiedenen Unterformen von Gal-8 erkennen und inwiefern sich die Verwendung verschiedener Primärantikörper auf die Erkennung unterschiedlicher Unterformen auswirkt. Weitere dahingehende Untersuchungen sind notwendig, bevor Gal-8 als diagnostisches oder therapeutisches Ziel in Betracht gezogen werden kann.

7.5. Galectin-9

Labrie et al. konnten in ihrer Studie beobachten, dass OvCa-Fälle mit perinucleärer punktförmiger Anfärbbarkeit im Tumor ein reduziertes OS aufwiesen [83].

In unserer Studie hingegen zeigte sich ein komplexeres Bild [109]. Gal-9 konnte dabei aber weder als positiver noch als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden, obwohl die verschiedenen anhand der Gal-9 Expression eingeteilten Gruppen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihres Gesamtüberlebens zeigten. Im Vergleich mit der Gruppe ohne Gal-9 Expression zeigte die Gruppe mit moderater Gal-9 Expression ein schlechteres OS, hingegen die Gruppe mit hoher Gal-9 Expression ein verbessertes OS [109].

Zunächst stellt sich daraufhin die Frage, wie unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu der Studie von Labrie et al. zustande kommen können. Es muss festgestellt werden, dass in den beiden Studien zwar eng verwandte, jedoch unterschiedliche

Methoden zur Antigendetektion verwendet wurden: IF und IHC. Angesichts der erfahrungsgemäß präziseren räumlichen Auflösung einer IF-Färbung ist es nicht verwunderlich, dass die von Labrie et al. beschriebene perinucleäre Färbung in unserer Studie unter der Verwendung von IHC nicht beobachtet werden konnte. Gleichwohl würden Fälle mit diesem Färbemuster mit hoher Wahrscheinlichkeit in unserem Kollektiv zu finden sein. Angenommen, es fänden sich Fälle, die in der IF eine punktförmige perinucleäre Färbung zeigen, überwiegend in unserer Gruppe mit moderater Anfärbbarkeit in der IHC wieder, könnte hier gegebenenfalls doch eine gewisse Übereinstimmung der beiden Studien vorliegen. Zum anderen besteht für Gal-9, wie auch für Gal-8, die Möglichkeit, dass verschiedene Antikörper die unterschiedlichen Isoformen von Gal-9 mit unterschiedlicher Affinität erkennen. Das würde eine mögliche Erklärung darstellen, warum verschiedene Studien hier zu unterschiedlichen Beobachtungen kommen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, wie sich der von uns beobachtete komplexe Zusammenhang zwischen Gal-9 Expression und der Prognose erklären lässt. Dafür muss man feststellen, dass Gal-9 in verschiedenen tumorbiologisch relevanten Mechanismen in zum Teil gegensätzlichen Rollen beteiligt ist. So konnten beispielsweise in vitro Experimente zeigen, dass Gal-9 in der Lage ist, Apoptose in OvCa-Zellen zu induzieren [114]. Weiterhin konnte eine Studie im Mamma-Ca zeigen, dass die Expression von Gal-9 auf Tumorzellen die Zelladhäsion zu den Bestandteilen der Extrazellulärmatrix verringert und Patientinnen mit Tumoren ohne Gal-9 Expression häufiger Metastasen ausbildeten [115]. Damit stellen die Implikationen von Gal-9 in Apoptose und die in Zelladhäsion und Metastasierung, sofern sie auch für das OvCa bestätigt werden können, mögliche Erklärungsansätze für eine durch Gal-9 verbesserte Prognose von OvCa-Patientinnen dar.

Betrachtet man die tumorimmunologische Funktion von Gal-9, zeigt sich jedoch ein unterschiedliches Bild. Die Bindung von Gal-9 an das Oberflächenprotein Tim-3 konnte als zentraler Mechanismus, zunächst auf CD4⁺ T-Helferzellenzellen vom Typ-1 (T_H1-Zellen), identifiziert werden, der zum Absterben von T_H1-Zellen führt [86]. Auch für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (T_c-Zellen) konnte ein analoger Mechanismus nachgewiesen werden [87]. Im OvCa sprechen Tumor-infiltrierende Lymphozyten generell sowie insbesondere tumorinfiltrierende T_c-Zellen für eine bessere Prognose [116]. In einem Mausmodell zur Autoimmunarthritis konnte gezeigt werden, dass Gal-9 die Anzahl von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-Zellen) durch Gal-9 erhöht [117]. T_{reg}-Zellen sind für ihre immunsuppressiven und daher krankheitsfördernden Eigenschaften in Malignomen bekannt [118]. Im OvCa sprechen folglich auch T_{reg}-Zellen in der Tumorumgebung für eine reduzierte Prognose [116]. Somit könnte eine erhöhte Gal-9 Expression im OvCa eine reduzierte Prognose von OvCa-

Patientinnen erklären, angenommen, die Tumorzellen können über Gal-9 Sekretion auf tumorinfiltrierende T_c-Zellen oder T_{reg}-Zellen einwirken.

Unter der Annahme, dass die verschiedenen Effekte von Gal-9 bei unterschiedlichen Konzentrationen vorrangig in Erscheinung treten, könnten die prognosefördernde Wirkweise von Gal-9 über Apoptose, Zelladhäsion und Metastasierung auf der einen Seite und die prognoseverschlechternde Wirkweise von Gal-9 über tumorimmunologische Faktoren zu dem von uns beobachteten komplexen Zusammenhang von Gal-9 und der Prognose von OvCa-Patientinnen führen. Weitere Studien sind aber notwendig, um diese Mechanismen in Zusammenhang mit Gal-9 im OvCa nachzuweisen.

7.6. Fazit

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich jedes der Proteine Gal-1, -3, -7, -8 und -9 in unterschiedlichem Ausmaß und mit unterschiedlichem Verteilungsmuster im OvCa-Gewebe immunhistochemisch detektieren lässt. Vergleicht man innerhalb unseres Patientinnen-Kollektivs verschiedene anhand ihrer jeweiligen Galectin-Expression eingeteilte Gruppen, so zeigen sie mitunter signifikante Unterschiede hinsichtlich ihres Gesamtüberlebens. Dabei stellen die verschiedenen Galectin-Expressionen entweder negative (Gal-1, Gal-7) oder positive (Gal-3, Gal-8) prognostische Faktoren dar oder lassen sich nicht eindeutig zuordnen (Gal-9). Unter zusätzlicher Betrachtung vorliegender Studien anderer Arbeitsgruppen lassen sich vor allem die Galectine-1 und -7 als vielversprechende Ziele für weitergehende Studien zur diagnostischen oder therapeutischen Nutzung identifizieren. Die übrigen hier untersuchten Galectine zeigen im tumorbiologischen Gesamtkontext eine offenbar komplexere Rolle (Gal-3 und Gal-9) und/oder bilden in Zusammenschau mit anderen Studien ein noch zu unvollständig untersuchtes und teilweise auch widersprüchliches Gesamtbild ab (Gal-8 und Gal-9). Insbesondere die Implikationen von Gal-3 und Gal-9 wie auch von Gal-7 im Bereich der Tumorimmunologie können jedoch weiter an Bedeutung gewinnen, betrachtet man das wachsende Feld der Immunonkologie und die daraus resultierenden zielgerichteten Therapieoptionen.

8. Abstract

The poor prognosis of ovarian carcinoma is determined by late-stage diagnosis and the few, mostly unspecific therapy options. Evaluation of tumor proteins as prognostic factors is a possibility to identify tumor proteins that can be used diagnostically or therapeutically. Members of the Galectin protein family have already been identified as prognostic factors in various carcinomas. We investigated the prognostic properties of galectins-1, -3, -7, -8 and -9 in ovarian cancer. Galectin expression was determined using immunohistochemistry and light microscopy. Galectin expression data was correlated with clinical and pathological parameters as well as survival data. Gal-1 expression in the tumor cells and the peritumoral stroma could be identified as negative prognostic factors. Gal-3 expression in the nuclei of tumor cells is a positive prognostic factor. A higher Gal-7 expression in cancer cells has a negative prognostic influence. In our collective, Gal-8 served as a positive prognostic factor, while Gal-9 expression determined overall survival in a more complex way. Our results indicate that especially Gal-1 and -7 could be promising targets for future diagnostic and therapeutic use.

9. Summary

The two scientific papers listed in section 4 evaluate the prognostic properties of the selected galectins-1, -3, -7, -8 and -9 in ovarian cancer (OvCa) and thus provide a basis for further studies regarding the diagnostic and therapeutic implications of these proteins. Galectin expression was determined using immunohistochemistry (IHC) on histological sections from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Either tissue sections (Gal-1, -3, -7) or tissue micro array (TMA) sections (Gal-8, -9) were used. Staining intensity was determined using light microscopy and then correlated with pre-existing clinical and pathological parameters as well as with survival data of the collective.

9.1. Galectin-1

Kim et al. demonstrated that patients with strong peritumoral Gal-1 expression have a worse prognosis [70]. In contrast, Chen et al. evaluated Gal-1 expression in the tumor cells themselves; here cases with high Gal-1 expression showed reduced survival (PFS and OS) [71]. In comparison to the two previous studies which were limited to the description of only a single localization, in our study Gal-1 expression was evaluated differentially in both localizations – in the tumor as well as in the peritumoral stroma [99]. In tumor cells, it has been further differentiated between

expression in the cytoplasm and the nucleus. In univariate analysis using Kaplan-Meier curves, both high cytoplasmic and high peritumoral expression correlated with reduced OS [99]. In multivariate analysis, however, only Gal-1 expression in the stroma served as an independent prognostic factor next to grading and FIGO stage [99]. Regarding the correlations between the cytoplasmic Gal-1 expression and clinical and pathological parameters, an explanation becomes apparent. Cytoplasmic Gal-1 expression shows significant correlations with common prognostic factors like histological subtype, grading and FIGO stage which do not exist with the peritumoral Gal-1 expression [99].

Gal-1 expression in the stroma has also been previously described in other cancer types [100, 101]. In addition, in OvCa it could be demonstrated that Gal-1 concentration measured in the peritumoral stroma is higher than that in the non-tumor-infiltrated stroma [102]. Also, mechanisms for the accumulation of Gal-1 in the peritumoral stroma have been elucidated: Fibroblasts that were treated with cell culture medium conditioned by OvCa cells showed increased Gal-1 expression, even if the OvCa cells themselves did not express Gal-1 [102].

The positive correlation between peritumoral and tumor-specific cytoplasmic Gal-1 expression we observed supports these in-vitro experiments and shows the interdependence of Gal-1 expression in tumor and peritumoral stroma [99]. Nevertheless, further analyzes is required to explain cases with Gal-1 negative tumor cells but Gal-1 positive peritumoral stroma.

We and others were able to demonstrate the negative prognostic significance of Gal-1 expression in OvCa [70, 71, 99]. Gal-1 therefore is a promising target protein for further evaluation of diagnostic or therapeutic use.

9.2. Galectin-3

In a study by Brustmann, cases without nuclear Gal-3 expression displayed a reduced prognosis [75]. Cytoplasmic expression alone, however, did not correlate with survival [75]. In contrast, Kim et al. observed in their study that patients with increased cytoplasmic Gal-3 expression have a reduced PFS [76].

In our study, cases with nuclear Gal-3 expression had a better OS than cases without nuclear Gal-3 expression in univariate analysis, confirming the result of Brustmann, while Gal-3 expression in the cytoplasm or in the peritumoral stroma also showed no correlation with OS [99]. Nuclear Gal-3 expression had significant correlations with the histological subtype, the tumor stage and the patient's age and therefore could not serve as an independent prognostic factor in multivariate analysis [99].

For Gal-3, several different binding partners with different tumor biological functions in the cell nucleus and cytosol have been described [103]. For example, Gal-3 mimics the function of the anti-apoptotic and therefore oncogenic protein Bcl-2 in the cytosol thus preventing apoptosis [104]. In the nucleus, however, Gal-3 interacts with tumor-associated transcription factors, for example in the Wnt signaling pathway [105]. The improved prognosis observed by us and others for OvCa in patients with nuclear Gal-3 expression in tumor cells, however, cannot yet be explained this way. Due to its prognostic effect which seems to be determined mainly by the subcellular localization and generally in a positive manner, Gal-3 appears to be rather unsuitable as a therapeutic target in OvCa using a classic inhibitor. However, a better understanding of the mechanisms that determine the subcellular localization of Gal-3 in OvCa cells could reveal other factors that may be more suitable as a therapeutic target in OvCa than Gal-3 itself.

In addition to the expression of Gal-3 in tumor cells, the expression of Gal-3 in macrophages, here originally under the protein name Mac-2, was described very early on [106]. So-called tumor-associated macrophages (TAMs) significantly contribute to the progression of the disease in numerous malignancies and also represent a potential therapeutic target [107, 108]. However, the role of Gal-3 positive TAMs in OvCa was not examined in our study and therefore remains the subject of further research in OvCa as well as in other tumor entities.

9.3. Galectin-7

Kim et al. observed in their study that cases with high Gal-7 expression have a reduced OS [79]. In our study, we also observed that within our study collective, cases with high Gal-7 expression showed reduced OS compared to cases with low Gal-7 expression, while cases without Gal-7 expression had the best OS [99]. Thus, the negative prognostic significance of Gal-7 could be illustrated in a kind of “dose-dependent” way in our collective. This way, the negative influence of Gal-7 on overall survival of OvCa patients, as demonstrated by Kim et al., could be confirmed [79]. As in the study by Labrie et al. described, we too observed Gal-7 predominantly in the cytoplasm of OvCa cells, more rarely in the cell nucleus [99].

Taken together, Gal-7 represents a promising tumor protein for further studies on diagnostic and therapeutic utility, despite the few studies that have already elucidated the prognostic properties, the molecular biological functions and its implications in OvCa in particular.

9.4. Galectin-8

In the study conducted by Labrie et al., higher Gal-8 concentrations in the blood plasma of OvCa patients correlated with a significantly reduced survival (PFS and OS) while the expression in the tumor had no prognostic significance [83].

In our study, however, cases with high cytoplasmic Gal-8 expression showed a significantly increased OS compared to cases with no or low Gal-8 expression [109]. In other malignancies, implications of Gal-8 in various tumor biological processes such as cell adhesion, cell migration, apoptosis, angiogenesis, cell proliferation and metastasis have been described, but primarily in a disease-promoting manner [110-113]. For OvCa in particular, mechanistic studies that could explain Gal-8's influence on survival of OvCa patients as observed by us or others, being positive or negative, are still missing. Furthermore, the extent to which the various subforms of Gal-8 occur in OvCa or whether or not they may fulfill different functions remains still elusive. Furthermore, we do not know whether and to what extent antibody-based detection methods such as IHC, IF or ELISA recognize the different subforms of Gal-8 and to what extent the use of different primary antibodies affects the detection of different subforms. Further studies are required before Gal-8 can be considered as a diagnostic or therapeutic target.

9.5. Galectin-9

Labrie et al. observed that OvCa cases with tumor staining in form of "perinuclear puncta" displayed a reduced OS [83].

In our study, however, we observed a more complex picture [109]. Gal-9 could neither be identified as a positive nor as a negative prognostic factor, although the various groups classified by Gal-9 expression showed significant differences regarding their OS. In comparison with the group with no Gal-9 expression, the group with moderate Gal-9 expression showed a poorer OS, while the group with high Gal-9 expression displayed improved OS [109].

The first question that arises is how different results compared to the study by Labrie et al. can be explained. Firstly, it must be noted that although closely related, different methods of antigen detection were used in the two studies: IF and IHC. Regarding the more precise spatial resolution of IF staining, it is not surprising that perinuclear staining as described by Labrie et al. could not be observed in our study using IHC. Nevertheless, cases with this staining pattern probably could have been found in our collective as well. Assuming that cases that show a punctiform perinuclear staining in the IF in our study would find themselves predominantly in our

group with moderate staining, there could be a certain overlap between the results of the two studies. On the other hand, for Gal-9 as well as for Gal-8, there may be the possibility that different antibodies recognize the different isoforms of Gal-9 with different affinities. This would be a possible explanation for different studies coming to different observations.

Besides, the question arises as to how the complex relationship between Gal-9 expression and prognosis observed by us can be explained. Therefore, it should be noted that Gal-9 is involved in various tumor-biologically relevant mechanisms, sometimes even in opposing roles. In vitro experiments, for instance, have shown that Gal-9 is able to induce apoptosis in OvCa cells [114]. Furthermore, in another study, the expression of Gal-9 in Mamma-Ca cells reduces cell adhesion to the components of the extracellular matrix and patients with Gal-9-negative tumors developed metastases more frequently [115]. Consequently, the implications of Gal-9 in apoptosis as well as in tumor cell adhesion and metastasis, as far as they can be confirmed for OvCa, represent possible explanations for a Gal-9-mediated improved prognosis in OvCa patients.

The immunological functions of Gal-9, however, reveal a different picture. Binding of Gal-9 to the surface protein Tim-3 could be identified as a central mechanism, initially on CD4⁺ T-helper cell type 1 (T_H1-cells) which leads to cell death of T_H1-cells [86]. An analogous mechanism could also be demonstrated for cytotoxic CD8⁺ T-cells (T_c-cells) [87]. In the OvCa, tumor-infiltrating lymphocytes in general and tumor-infiltrating T_c-cells in particular correlate with a better prognosis [116]. In a mouse model for autoimmune arthritis it was shown that Gal-9 increases the number of regulatory T-cells (T_{reg}-cells) through Gal-9 [117]. T_{reg}-cells are known for their immunosuppressive and therefore disease-promoting properties in malignancies [118]. In OvCa, T_{reg}-cells in the tumor environment therefore correlate with a reduced prognosis [116]. Thus, increased Gal-9 expression in OvCa could explain a reduced prognosis in OvCa patients, assuming that tumor cells are able to stimulate tumor-infiltrating T_c-cells or T_{reg}-cells via Gal-9 secretion.

Conjectured that various effects of Gal-9 appear primarily at different concentration levels, the prognosis-benefitting aspects of Gal-9 via apoptosis, cell adhesion and metastasis on the one hand and the prognosis-impairing aspects of Gal-9 via immunological functions on the other hand may explain the complex relationship between Gal-9 and the prognosis of OvCa patients that we observed. However, further studies are necessary to confirm these mechanisms in OvCa.

9.6. Conclusion

Each of the proteins Gal-1, -3, -7, -8 and -9 could be detected immunohistochemically to different extents displaying different distribution patterns in OvCa. Comparing different groups within our patient collective based on galectin expression, significant differences in terms of their overall survival could be detected. Different galectin expressions served as either negative (Gal-1, Gal-7) or positive (Gal-3, Gal-8) prognostic factors, but sometimes could not be clearly assigned (Gal-9). With additional consideration of further studies, the galectins-1 and -7 in particular could be identified as promising targets for further studies on diagnostic or therapeutic use. The other galectins examined either show a rather complex role in the overall tumour-biological context (Gal-3 and Gal-9) and/or are still too incompletely understood, with sometimes even contradictory results (Gal-8 and Gal-9). However, the implications of Gal-3 and Gal-9, as well as Gal-7 in the field of tumor immunology in particular, may be gaining in importance, considering the growing field of immunoncology and the implicated options for targeted therapies.

10. Veröffentlichung I

Schulz, H.; Schmoeckel, E.; Kuhn, C.; Hofmann, S.; Mayr, D.; Mahner, S.; Jeschke, U. Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1230.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486053/>

11. Veröffentlichung II

Schulz, H.; Kuhn, C.; Hofmann, S.; Mayr, D.; Mahner, S.; Jeschke, U.; Schmoeckel, E. Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 323.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796266/>

12. Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., et al., *Cancer Statistics, 2021*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(1): p. 7-33.
2. SEER Cancer Stat Facts: Ovarian Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, M. Accessed 31.03.2022; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
3. Webb, P.M., A.C. Green, and S.J. Jordan, *Trends in hormone use and ovarian cancer incidence in US white and Australian women: implications for the future*. Cancer Causes Control, 2017. **28**(5): p. 365-370.
4. Stewart, C., C. Ralyea, and S. Lockwood, *Ovarian Cancer: An Integrated Review*. Semin Oncol Nurs, 2019. **35**(2): p. 151-156.
5. La Vecchia, C., *Ovarian cancer: epidemiology and risk factors*. Eur J Cancer Prev, 2017. **26**(1): p. 55-62.
6. Momenimovahed, Z., et al., *Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors*. Int J Womens Health, 2019. **11**: p. 287-299.
7. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.0, 2021, AWMF-Registernummer: 032/035OL, Accessed 31.03.2022; Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>.
8. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
9. Mavaddat, N., et al., *Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(11): p. 812-22.
10. Buys, S.S., et al., *Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2295-303.
11. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2473-83.
12. Perren, T.J., et al., *A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2484-96.
13. Banerjee, S., et al., *First-line PARP inhibitors in ovarian cancer: summary of an ESMO Open - Cancer Horizons round-table discussion*. ESMO Open, 2020. **5**(6): p. e001110.
14. Gonzalez-Martin, A., et al., *Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2019. **381**(25): p. 2391-2402.
15. Ledermann, J.A., *PARP inhibitors in ovarian cancer*. Ann Oncol, 2016. **27 Suppl 1**: p. i40-i44.
16. O'Cearbhaill, R.E., *Using PARP Inhibitors in Advanced Ovarian Cancer*. Oncology (Williston Park), 2018. **32**(7): p. 339-43.
17. Moore, K., et al., *Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2018. **379**(26): p. 2495-2505.
18. Ray-Coquard, I., et al., *Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2019. **381**(25): p. 2416-2428.
19. Coleman, R.L., et al., *Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2019. **381**(25): p. 2403-2415.
20. Guan, L.Y. and Y. Lu, *New developments in molecular targeted therapy of ovarian cancer*. Discov Med, 2018. **26**(144): p. 219-229.

12. Literaturverzeichnis

21. Leary, A., D. Tan, and J. Ledermann, *Immune checkpoint inhibitors in ovarian cancer: where do we stand?* Ther Adv Med Oncol, 2021. **13**: p. 17588359211039899.
22. Curiel, T.J., et al., *Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity.* Nat Med, 2003. **9**(5): p. 562-7.
23. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.* Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
24. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Female genital tumours.* Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 4). Available from: <https://publications.iarc.fr/592>.
25. Peres, L.C., et al., *Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage.* J Natl Cancer Inst, 2019. **111**(1): p. 60-68.
26. Peres, L.C., et al., *Histotype classification of ovarian carcinoma: A comparison of approaches.* Gynecol Oncol, 2018. **151**(1): p. 53-60.
27. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication.* J Gynecol Oncol, 2015. **26**(2): p. 87-9.
28. Labidi-Galy, S.I., et al., *High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube.* Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1093.
29. FDA-NIH Biomarker Working Group, in *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]*. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016-. Understanding Prognostic versus Predictive Biomarkers. 2016 Dec 22. Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD).
30. Fan, Y. and G. Yin, *Concordance index: Surrogacy of progression-free survival for overall survival.* Contemp Clin Trials, 2021. **104**: p. 106353.
31. Jayson, G.C., et al., *Ovarian cancer.* Lancet, 2014. **384**(9951): p. 1376-88.
32. Lheureux, S., et al., *Epithelial ovarian cancer.* Lancet, 2019. **393**(10177): p. 1240-1253.
33. Davidson, B. and C.G. Trope, *Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects.* Womens Health (Lond), 2014. **10**(5): p. 519-33.
34. du Bois, A., et al., *Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO).* Cancer, 2009. **115**(6): p. 1234-44.
35. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.* Cell, 1994. **76**(4): p. 597-8.
36. Barondes, S.H., et al., *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins.* J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
37. Leffler, H., et al., *Introduction to galectins.* Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 433-40.
38. Young, A.R. and E.N. Meeusen, *Galectins in parasite infection and allergic inflammation.* Glycoconj J, 2002. **19**(7-9): p. 601-6.
39. Rabinovich, G.A., et al., *Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 313-20.
40. Dunphy, J.L., et al., *Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin.* J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32106-13.
41. Gray, C.A., et al., *Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophectoderm.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 7982-7.
42. Si, Y., et al., *Human galectin-16 has a pseudo ligand binding site and plays a role in regulating c-Rel-mediated lymphocyte activity.* Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2021. **1865**(1): p. 129755.

43. Tweedie, S., et al., *Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2021*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D939-D946.
44. HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom Accessed 31.03.2022; Available from: <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/629>.
45. Ebrahim, A.H., et al., *Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy*. Ann Transl Med, 2014. **2**(9): p. 88.
46. Cummings, R.D. and F.T. Liu, *Galectins*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
47. Cooper, D.N., *Galectinomics: finding themes in complexity*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 209-31.
48. Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang, *Intracellular functions of galectins*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 263-73.
49. Brewer, C.F., M.C. Miceli, and L.G. Baum, *Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(5): p. 616-23.
50. Wilson, T.J., et al., *The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes*. Biochem J, 1989. **261**(3): p. 847-52.
51. Cooper, D.N. and S.H. Barondes, *Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism*. J Cell Biol, 1990. **110**(5): p. 1681-91.
52. Hernandez, J.D. and L.G. Baum, *Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate*. Glycobiology, 2002. **12**(10): p. 127R-36R.
53. Nakahara, S. and A. Raz, *On the role of galectins in signal transduction*. Methods Enzymol, 2006. **417**: p. 273-89.
54. Yang, R.Y. and F.T. Liu, *Galectins in cell growth and apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(2): p. 267-76.
55. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 29-41.
56. Rabinovich, G.A. and A. Gruppi, *Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease*. Parasite Immunol, 2005. **27**(4): p. 103-14.
57. Hsu, D.K., R.Y. Yang, and F.T. Liu, *Galectins in apoptosis*. Methods Enzymol, 2006. **417**: p. 256-73.
58. Rabinovich, G.A., et al., *An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 143-58.
59. van den Brule, F., S. Califice, and V. Castronovo, *Expression of galectins in cancer: a critical review*. Glycoconj J, 2002. **19**(7-9): p. 537-42.
60. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
61. Thijssen, V.L., et al., *Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2819-27.
62. Girotti, M.R., et al., *Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression*. J Exp Med, 2020. **217**(2).
63. Balan, V., P. Nangia-Makker, and A. Raz, *Galectins as cancer biomarkers*. Cancers (Basel), 2010. **2**(2): p. 592-610.
64. Long, B., et al., *Clinical characteristics and prognostic significance of galectins for patients with gastric cancer: A meta-analysis*. Int J Surg, 2018. **56**: p. 242-249.

65. Shao, Q., et al., *Prognostic role of galectins expression in patients with hepatic cancer: A meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2020. **99**(15): p. e19622.
66. Sun, Q., et al., *Prognostic and diagnostic significance of galectins in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Cancer Cell Int*, 2019. **19**: p. 309.
67. Pergialiotis, V., et al., *Galectins-1, -3, -7, -8 and -9 as prognostic markers for survival in epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2021. **152**(3): p. 299-307.
68. Allen, H.J., et al., *Role of galaptin in ovarian carcinoma adhesion to extracellular matrix in vitro*. *J Cell Biochem*, 1990. **43**(1): p. 43-57.
69. Skrincosky, D.M., H.J. Allen, and R.J. Bernacki, *Galaptin-mediated adhesion of human ovarian carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins*. *Cancer Res*, 1993. **53**(11): p. 2667-75.
70. Kim, H.J., et al., *High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(12): p. 1914-21.
71. Chen, L., et al., *Galectin-1 promotes tumor progression via NF-kappaB signaling pathway in epithelial ovarian cancer*. *J Cancer*, 2017. **8**(18): p. 3733-3741.
72. Oda, Y., et al., *Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen*. *Gene*, 1991. **99**(2): p. 279-83.
73. van den Brule, F.A., et al., *Differential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas*. *Eur J Cancer*, 1994. **30A**(8): p. 1096-9.
74. van den Brule, F.A., et al., *Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma*. *Hum Pathol*, 1996. **27**(11): p. 1185-91.
75. Brustmann, H., *Epidermal growth factor receptor expression in serous ovarian carcinoma: an immunohistochemical study with galectin-3 and cyclin D1 and outcome*. *Int J Gynecol Pathol*, 2008. **27**(3): p. 380-9.
76. Kim, M.K., et al., *Overexpression of Galectin-3 and its clinical significance in ovarian carcinoma*. *Int J Clin Oncol*, 2011. **16**(4): p. 352-8.
77. Madsen, P., et al., *Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(11): p. 5823-9.
78. Magnaldo, T., F. Bernerd, and M. Darmon, *Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid*. *Dev Biol*, 1995. **168**(2): p. 259-71.
79. Kim, H.J., et al., *Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(4): p. 1555-61.
80. Labrie, M., et al., *Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2014. **5**(17): p. 7705-21.
81. Hadari, Y.R., et al., *Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(7): p. 3447-53.
82. Lahm, H., et al., *Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001. **127**(6): p. 375-86.
83. Labrie, M., et al., *Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13244.
84. Wada, J. and Y.S. Kanwar, *Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(9): p. 6078-86.
85. Wada, J., et al., *Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(10): p. 2452-61.
86. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1245-52.

12. Literaturverzeichnis

87. Wang, F., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8+ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft*. Cell Immunol, 2007. **250**(1-2): p. 68-74.
88. Wu, J., et al., *The expression of Tim-3 in peripheral blood of ovarian cancer*. DNA Cell Biol, 2013. **32**(11): p. 648-53.
89. Yang, R., et al., *Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 832.
90. Wdowiak, K., et al., *Galectin Targeted Therapy in Oncology: Current Knowledge and Perspectives*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
91. Ito, K., et al., *Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress*. Angiogenesis, 2011. **14**(3): p. 293-307.
92. Griffioen, A.W., et al., *Anginex, a designed peptide that inhibits angiogenesis*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 2): p. 233-42.
93. Thijssen, V.L., et al., *Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15975-80.
94. Dings, R.P., et al., *Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(13): p. 932-6.
95. Dings, R.P., et al., *Antitumor agent calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding*. J Med Chem, 2012. **55**(11): p. 5121-9.
96. Astorgues-Xerri, L., et al., *OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis*. Eur J Cancer, 2014. **50**(14): p. 2463-77.
97. Hossein, G., et al., *Synergistic effects of PectaSol-C modified citrus pectin an inhibitor of Galectin-3 and paclitaxel on apoptosis of human SKOV-3 ovarian cancer cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(12): p. 7561-8.
98. Vladiou, M.C., et al., *Design of a peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin*. Oncotarget, 2015. **6**(38): p. 40970-80.
99. Schulz, H., et al., *Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
100. Xu, X.C., A.K. el-Naggar, and R. Lotan, *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications*. Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 815-22.
101. Sanjuan, X., et al., *Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression*. Gastroenterology, 1997. **113**(6): p. 1906-15.
102. van den Brule, F., et al., *Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 377-86.
103. Haudek, K.C., et al., *Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1800**(2): p. 181-9.
104. Akahani, S., et al., *Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family*. Cancer Res, 1997. **57**(23): p. 5272-6.
105. Kim, S.J. and K.H. Chun, *Non-classical role of Galectin-3 in cancer progression: translocation to nucleus by carbohydrate-recognition independent manner*. BMB Rep, 2020. **53**(4): p. 173-180.
106. Cherayil, B.J., S.J. Weiner, and S. Pillai, *The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 1959-72.
107. Ostuni, R., et al., *Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 229-39.
108. Komohara, Y., et al., *Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **99**(Pt B): p. 180-185.
109. Schulz, H., et al., *Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).

12. Literaturverzeichnis

110. Delgado, V.M., et al., *Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8*. FASEB J, 2011. **25**(1): p. 242-54.
111. Levy, Y., et al., *Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31285-95.
112. Metz, C., et al., *Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells*. Biol Res, 2016. **49**(1): p. 33.
113. Chen, C., et al., *Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis*. Br J Cancer, 2014. **110**(3): p. 741-52.
114. Jafari, S.M., et al., *Galectin-9 induces apoptosis in OVCAR-3 ovarian cancer cell through mitochondrial pathway*. Res Pharm Sci, 2018. **13**(6): p. 557-565.
115. Yamauchi, A., et al., *Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer*. Breast J, 2006. **12**(5 Suppl 2): p. S196-200.
116. Santoiemma, P.P. and D.J. Powell, Jr., *Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer*. Cancer Biol Ther, 2015. **16**(6): p. 807-20.
117. Seki, M., et al., *Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis*. Clin Immunol, 2008. **127**(1): p. 78-88.
118. Facciabene, A., G.T. Motz, and G. Coukos, *T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2162-71.

13. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich bin ihm dankbar für die vielen interessanten gemeinsamen Gespräche und dafür, dass er mir die Freude an wissenschaftlichem Arbeiten vermittelte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Mayr und Frau PD Dr. Elisa Schmoeckel, die mir stets mit Rat und Expertise zur Seite standen und mich für das Fach Pathologie begeisterten.

Herrn Direktor Prof. Dr. Sven Mahner möchte ich aufrichtig für die Möglichkeit danken, an der ehrwürdigen Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München zu promovieren.

Frau Christina Kuhn und Frau Simone Hofmann danke ich für ihre Einweisung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente und das überaus herzliche Miteinander.

Frau Susanne Kunze, die ich zu meinem Bedauern selbst nicht mehr kennenlernen durfte, bin ich posthum sehr dankbar für ihre Vorarbeiten zu dem Thema.

Allen MitarbeiterInnen und DoktorandInnen möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor danken.

Frau Prof. Dr. Nina Ditsch und Frau PD Dr. Dr. Sabine Heublein gilt mein Dank für die Unterstützung während der Promotion.

Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann und dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) danke ich für die finanzielle Förderung.

Von Herzen danke ich meinen Eltern Karin und Dr. Ekkehard Schulz, meinem Bruder Dr. Mario Schulz und meinen Großeltern Tilde und Wilhelm Schneller für die Liebe und Unterstützung, mit der sie mich begleitet haben.

Laura Sturm und allen Freunden und Kommilitonen danke ich dafür, dass sie mein Medizinstudium zu einer wundervollen Zeit gemacht haben.