

Aus der
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



„Rolle von Galectinen und Siglec-8 beim Mammakarzinom“

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

vorgelegt von
Anna Trebo

aus
Bozen, Italien

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Udo Jeschke
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kääb
Dritter Gutachter: Priv. Doz. Dr. Julia Jückstock

Promovierte Mitbetreuerin: PD Dr. med. Anna Hester
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2023

Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Trebo, Anna

Name, Vorname

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

„Rolle von Galectinen und Siglec-8 beim Mammakarzinom“

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, 21.11.2023

Ort, Datum
Doktorand

Anna Trebo

Unterschrift Doktorandin bzw.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Publikationsliste	6
1. Beitrag zu den Veröffentlichungen	7
1.1 Beitrag zu Paper I	7
1.2 Beitrag zu Paper II	8
2. Einleitung	9
2.1 Brustkrebs	9
2.1.1 Epidemiologie	9
2.1.2 Einteilung und Therapie	9
2.2 Lektine.....	11
2.2.1 Galectine	11
2.2.2 Siglecs.....	13
3. Zusammenfassung	15
3.1 Angewandte Forschungsmethoden	15
3.2 Paper I: Ergebnisse und Diskussion	16
3.3 Paper II: Ergebnisse und Diskussion	18
3.4 Stärken und Limitationen	20
4. Abstract	21
4.1 Applied Research Methods.....	21
4.2 Paper I: Results and Discussion	21
4.3 Paper II: Results and Discussion	23
4.4 Strengths and Limitations	25
5. Literaturverzeichnis	26
Danksagung	34

Abkürzungsverzeichnis

BC	Breast Cancer, Brustkrebs
BRCA	Breast Cancer Tumorsuppressorgen
CRD	Carbohydrate Recognition Domain, Kohlenhydraterkennungsdomäne
DDFS	Distant Disease-free Survival, Zeitspanne bis zur Diagnose einer Metastasierung
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ER	Estrogen Receptor, Östrogenrezeptor
ErbB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2, Bezeichnung des Gens für HER2
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
IHC	Immunohistochemistry, Immunhistochemie
IRS	Immunoreactive Score, Immunoreaktiver Score
NK	Natürliche Killerzellen
NST	No Special Type, kein spezifischer Typ
OS	Overall Survival, Gesamtüberleben
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor, Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ
PR	Progesterone Receptor, Progesteronrezeptor
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Real-time Quantitative PCR, quantitative Echtzeit-PCR
TAM	Tumor-associated Macrophages, Tumor-assoziierte Makrophagen
TNBC	Triple-negative Breast Cancer, triple-negatives Mammakarzinom
WB	Western Blot

Publikationsliste

1. "High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients" April 2020 publiziert in *Cancers* [1]
2. "First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer" Februar 2021 publiziert in *IJMS* [2]

1. Beitrag zu den Veröffentlichungen

Ich wurde bei meinen Forschungsarbeiten für die Vollzeitforschung im Labor (06/2019 – 07/2020) durch das „Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der LMU“ gefördert. Das Projekt wurde von Prof. Dr. Udo Jeschke und PD Dr. med. Anna Hester initiiert. Ein positives Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der LMU München (Genehmigungsnummer 048-08) lag vor Beginn meiner Arbeit bereits vor.

1.1 Beitrag zu Paper I

Meine Aufgaben im Rahmen der Publikation „*High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients*“ [1] bestanden in der Versuchsplanung, der Versuchsdurchführung sowie der Datenauswertung und Anfertigung des Manuskripts.

Nach eingehender Recherche über etablierte sowie derzeit wissenschaftlich untersuchte Prognosefaktoren beim Mammakarzinom, recherchierte ich im Detail zur Datenlage von Galectinen bei Brustkrebs. Galectine wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Udo Jeschke bereits im Vorfeld an anderen gynäkologischen Tumoren untersucht, weshalb dadurch eine Datengrundlage aus anderen Tumorentitäten vorhanden war. Darauf beruhend erfolgte die Versuchsplanung in Zusammenarbeit mit meinen Betreuer*innen PD Dr. med. Anna Hester, Prof. Dr. Udo Jeschke und Prof. Dr. Nina Ditsch. Basierend auf den von mir durchgeführten Versuchsfärbungen am Kollektiv und den bereits vorhandenen Daten, wurden verschiedene Galectine für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt und die entsprechenden Versuche geplant.

Die Versuchsdurchführung umfasste immunhistochemische (IHC) und Immunfluoreszenzfärbungen, welche mit Hilfe von Christina Kuhn etabliert und von mir ausgeführt wurden. Die nachfolgende Datenerhebung erfolgte mittels des bereits etablierten Immunoreaktiven Scores (IRS). Die Experimente und anschließende Auswertung setzte ich in einem Zeitraum von 6 Monaten im Labor in der Frauenklinik der Universität München um.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten führte ich mit Hilfe von Prof. Dr. Udo Jeschke und PD Dr. med. Anna Hester durch. Anschließend fertigte ich das Manuskript an und stellte es in intensiver Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Anna Hester und Prof. Dr. Nina Ditsch fertig.

Wegen der intensiven Zusammenarbeit in der Versuchsplanung und bei der Fertigstellung des Manuskripts wurde die Erstautorenschaft mit Prof. Dr. Nina Ditsch geteilt. PD Dr. med. Anna Hester ist als Verantwortliche für die konzeptionelle Arbeit Letztautorin dieser Publikation. Prof. Dr. Udo Jeschke, der vor allem an der Versuchsplanung und der Auswertung beteiligt war, ist Coautor und als Leiter des Labors der „*Corresponding Author*“. Die restlichen Coautor*innen PD Dr. med. Helene Hildegard Heidegger, Dr. med. Christine Zeder-Goess, Prof. Dr. med. Thomas Kolben, PD Dr. med. Bastian Czogalla, alle als Ärzt*innen in der Frauenklinik der LMU tätig, Prof. Dr. med. Sven Mahner, Chefarzt der Frauenklinik der LMU, sowie die Pathologin PD Dr. Elisa Schmoeckel, waren an der schriftlichen Ausarbeitung des Manuskripts beteiligt.

1.2 Beitrag zu Paper II

Bei der zweiten Veröffentlichung „*First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer*“ [2] lagen meine Aufgaben ebenfalls in der Versuchsplanung, der Versuchsdurchführung sowie der Datenauswertung und Anfertigung des Manuskripts.

Nach eingehender Recherche über die aktuelle Datenlage zu Siglecs bei allen bisher untersuchten Erkrankungen und zielorientiert bei Brustkrebs erfolgte die Versuchsplanung zusammen mit meinen Betreuer*innen PD Dr. med. Anna Hester und Prof. Dr. Udo Jeschke. Da zu Galectinen bereits eine Datengrundlage vorhanden war und verschiedene Interaktionsmöglichkeiten zu Siglecs in der Literatur beschrieben sind, aber bislang noch keine Daten zu Siglec-8 beim Mammakarzinom vorlagen, war der Fokus dieser Arbeit darauf ausgerichtet, erste Daten dazu an unserem Kollektiv zu sammeln.

Die Versuchsdurchführung umfasste immunhistochemische Färbungen, welche mit Unterstützung von Christina Kuhn etabliert und von mir ausgeführt wurden, sowie die anschließende Datenerhebung mittels des bekannten IRS. Nach ersten Auswertungen erfolgte die Untersuchung des Proteins in Zellkulturversuchen. Versuche dazu, unter anderem qPCR und Western Blot (WB), wurden in Zusammenarbeit mit Martina Rahmeh etabliert und durchgeführt.

Die Auswertung mittels statistischer Berechnungen führte ich fortlaufend durch und darauf basierend plante ich weitere Experimente in Absprache mit Prof. Dr. Udo Jeschke und PD Dr. med. Anna Hester.

Abschließend sammelte ich alle Daten und verfasste in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Anna Hester diese Publikation.

Bei dieser Veröffentlichung trage ich die Erstautorenschaft. PD Dr. med. Anna Hester ist als Verantwortliche für die konzeptionelle Arbeit Letztautorin in der Autorenliste. Prof. Dr. Udo Jeschke, der vor allem an der Versuchsplanung und der Auswertung beteiligt war, erschien als Coautor und als Leiter des Labors als „*Corresponding Author*“. Die restlichen Coautor*innen Prof. Dr. Nina Ditsch, Dr. med. Tom Degenhardt, Christina Kuhn, Martina Rahmeh, Prof. Dr. med. Doris Mayr, PD Dr. med. Bastian Czogalla, Prof. Dr. med. Thomas Kolben, Dr. med. Sarah Meister, alle als Ärzt*innen in der Frauenklinik der LMU tätig, Prof. Dr. med. Sven Mahner, Chefarzt der Frauenklinik der LMU, sowie die Pathologin PD Dr. Elisa Schmoeckel, waren an der schriftlichen Ausarbeitung des Manuskripts beteiligt.

2. Einleitung

Die Einleitung enthält Grundlagen des Mammakarzinoms und der untersuchten Proteine. Bezüglich genauer Angaben zur Methodik und detaillierten Ergebnissen der einzelnen Studien wird auf die entsprechenden Originalarbeiten verwiesen, welche an entsprechender Stelle zitiert werden und sich im Anhang befinden.

2.1 Brustkrebs

Diese Dissertationsarbeit befasst sich mit molekularbiologischen Grundlagen des Mammakarzinoms. Molekularbiologische Merkmale können in der Pathogenese und Progression eine Rolle spielen, aber auch als prognostische Faktoren oder therapeutische Zielstrukturen eingesetzt werden. Hier sind z.B. Oberflächenproteine als mögliche Prädiktoren oder Angriffspunkte für Therapien als Zielstrukturen, sogenannte *targets*, bedeutsam. Neue *targets* haben die Behandlung des Brustkrebses in den letzten Jahren revolutioniert und zu einer deutlichen Prognoseverbesserung beigetragen. Daher ist es essenziell, die Expertise in diesem Bereich weiter aufzubauen.

2.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs spielt aufgrund seiner Häufigkeit eine zentrale Rolle in der heutigen medizinischen, gynäkologischen und onkologischen Versorgung von Patient*innen. Laut den Global Cancer Statistics Globocan hat Brustkrebs im Jahr 2020 mit 11,7% die höchste Inzidenz unter allen Krebsarten und verdrängt somit Lungenkrebs als häufigste Krebsart. Zudem stellt Brustkrebs weltweit die fünfthäufigste tumorbedingte Todesursache dar [3]. Die statistischen Auswertungen zeigen, dass die Inzidenzrate verbunden mit aggressiven Screeningmethoden stärker ansteigt als die Sterberate, was auf das gute klinische Management in frühen Stadien hindeutet, wobei dennoch eine hohe Mortalität bestehen bleibt [4].

In Deutschland werden jährlich circa 69.000 Neuerkrankungen mit der Diagnose Brustkrebs erfasst, dabei betrifft etwa 1% aller Neuerkrankungen Männer. Zwischen 2005 und 2009 zeigten die Neuerkrankungsraten einen durch die Einführung des Mammographie-Screenings erklärbaren Anstieg mit anschließend langsamem Rückgang [5].

2.1.2 Einteilung und Therapie

Zur Stadieneinteilung beim Mammakarzinom wird die TNM-Klassifikation verwendet. Klinisch-pathologische Kriterien geben dabei Aufschluss über die Ausdehnung des Krebses, die Tumorgroße (T), betroffene regionale Lymphknoten (N) und die Ausbreitung in entfernte metastatische Stellen (M) [6]. T, N und M werden in fünf prognostisch und therapeutisch relevante Stadien (Stadien 0-IV) zusammengefasst, welche Informationen über das Ausmaß der regionalen Erkrankung und die Metastasierung in entfernte Bereiche geben. Zur weiteren Einteilung wird in der Pathologie der Tumorgrad, das *Grading* (G), bestimmt, welcher die Aggressivität des Brustkrebses widerspiegelt, und einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt. Das *Grading* basiert auf dem Anteil der Krebszellen, Kerngrößenvariation und der Anzahl der Zellteilungen und gibt den Differenzierungsgrad (G1, G2 oder G3) an [7-9]. Histologisch werden Mammakarzinome nach der WHO-Klassifikation in 19 verschiedene Subtypen unterteilt, darunter invasive Karzinome ohne besonderen/spezifischen Typ (NST), lobuläre Karzinome und andere Karzinome mit besonderem Typ (einschließlich 17 verschiedener seltener Histotypen). [10]

Zu den biologischen Faktoren, die für Prognose und Therapie bedeutsam sind, gehören die Amplifikation des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2, genetisch kodiert durch ERBB2) und die Expression von Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR)). Außerdem können BRCA-Mutationen eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus gibt es viele weitere genetische Varianten und Genmutationen, die Proteine kodieren, welche beispielsweise eine Rolle bei DNA-Reparaturwegen spielen, und in einigen Fällen von Brustkrebs nachgewiesen werden konnten [11]. Die Behandlungsstrategien unterscheiden sich je nach histologischen und molekularen Subtypen [10, 12].

Diverse Klassifizierungen wurden entwickelt, wobei die biologiezentrierte intrinsische Klassifikation von Perou und Sorlie aus dem Jahr 2000 [7] basierend auf Genexpressionsmustern mehrere Subtypen unterscheidet: Luminal A und Luminal B, Basal-like, HER2-positiv, Normal-like und Claudin-low. In der klinischen Praxis wird typischerweise eine Einteilung in fünf Subtypen basierend auf immunhistochemisch bestimmten Merkmalen, insbesondere der Expression von ER, PR und HER2, verwendet. ER und/oder PR exprimierende Tumoren gelten als Hormonrezeptor-positiv Mammakarzinome, während Tumoren, die weder ER, PR noch HER2 exprimieren, als triple-negative Mammakarzinome (TNBC) bezeichnet werden [10]. Folgende Untergruppen werden unterschieden: 1) Luminal A-like Tumoren mit hoher Expression von PR und ER, niedrigem *Grading* und niedrigen Proliferationsraten. 2) Luminal B-like HER2-negative Tumoren mit niedriger PR- und ER-Expression und einem höheren *Grading*. 3) Luminal B-like HER2-positiv Tumoren. 4) HER2-positiv nicht-luminale Tumoren. 5) TNBC mit der schlechtesten Prognose. [12]

Die beiden wichtigsten Säulen in der Brustkrebsbehandlung bestehen aus der lokoregionären Behandlung und der systemischen Therapie. Die Therapie des Mammakarzinoms besteht aus multimodalen Strategien, welche die verschiedenen Klassifikationen und Faktoren berücksichtigt. Die chirurgisch operative Therapie, oft in Verbindung mit einer Radiotherapie wird beim primären, nicht-metastasierten Mammakarzinom angewandt. Die systemische Therapie wird je nach Subtyp angepasst, wobei neben der klassischen Chemotherapie aber auch viele weitere spezifische Therapieoptionen etabliert wurden [10]. Neue prognostische Faktoren und *targets* beeinflussen die systemische Therapie zunehmend, so wird etwa die endokrine Therapie bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren angewandt, die Anti-HER2-Therapie bei HER2-positiven Tumoren und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren bei BRCA-Mutationsträger*innen [13]. Zunehmend an Bedeutung gewinnt aktuell die Immuntherapie und zukünftige Konzepte zielen auf eine Individualisierung der Therapie ab [10, 12, 14-16].

Deshalb nimmt die Forschung auf molekularer Ebene einen hohen Stellenwert in der Entwicklung neuer Therapiekonzepte ein. Einflüsse auf bekannte Rezeptoren, wie HER2, aber auch die Untersuchung neuer Oberflächenproteine stellen aktuell zentrale Forschungsvorhaben dar. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit war es ein Zielvorhaben, verschiedene Proteine bzw. verschiedene Lektine, als mögliche Prognosefaktoren oder therapeutische Angriffspunkte zu erforschen. Dabei stand ein Patientinnenkollektiv an OP-Präparaten des Universitätsklinikums LMU München zur Verfügung, sowie verschiedene Brustkrebszelllinien für *in-vitro* Versuche.

2.2 Lektine

Im Fokus dieser Promotionsarbeit stand die Untersuchung und Bedeutung der Expression verschiedener Proteine aus der Gruppe der Lektine. Lektine sind eine große Gruppe von Proteinen mit vielfältigen biologischen Aufgaben. Durch die Fähigkeit, spezifische Kohlenhydratstrukturen zu binden, sind sie in der Lage, spezifisch an Zellen zu binden und so Zell-Zell-Interaktionen auszulösen und zu beeinflussen und spielen somit auch als Akteure des Immunsystems eine wichtige Rolle.

Aus der Gruppe der Lektine wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst zuckerbindende Proteine, Galectine, in einem Mammakarzinom-Kollektiv untersucht. Es gibt eine breite Gruppe an Galectinen mit vielen Funktionen, wie Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Adhäsion und Transmembransignalübertragungen [17]. Auch Siglecs gehören zur Gruppe der Lektine und stellen eine Gruppe an Transmembranproteinen mit einem ähnlichen Funktionsspektrum dar [18]. Auch aus dieser Gruppe wurden Proteine für diese Promotionsarbeit untersucht. Beide Gruppen wurden in mehreren Tumorarten und anderen Erkrankungen bereits untersucht und sind als mögliche *targets* in den Fokus der Wissenschaft gerückt.

Für die erste Veröffentlichung wurde die spezifische Rolle von Gal-7 und Gal-8 in einer größeren Kohorte primärer nicht-metastasierter Mammakarzinome von Patientinnen untersucht, die in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LMU Klinikums München behandelt wurden. Durch immunhistochemische Färbungen konnte das genaue Expressionsmuster in den Tumorzellen sowie in den Tumor umgebenden Immunzellen sowie deren prognostische Bedeutung ermittelt werden.

Die wissenschaftliche Arbeit für die zweite Publikation zielte darauf ab, erste Hinweise auf eine mögliche Rolle von Siglec-8 bei Brustkrebs zu finden. Umfassende molekularbiologische Untersuchungen ermöglichten es, erste Daten darüber zu generieren.

2.2.1 Galectine

Im Jahr 1994 wurden Galectine zum ersten Mal beschrieben [19, 20]. Es handelt sich um eine Gruppe Zucker-bindender Proteine, welche an Galactose enthaltende Glykane über N- oder O-Glykosylierung binden [19, 20]. Auf genetischer Ebene wurden zwölf Galectin kodierende Gene beschrieben [21]. Galectine können in mehrere Untergruppen unterteilt werden, basierend auf strukturellen Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRDs). Dabei unterscheidet man dimere Galectine (Galectin-1,-2,-7,-10,-13,-14) mit zwei identischen CRD-Untereinheiten, Tandem-Galectine (Galectin-4,-8,-9,-12) mit zwei unterschiedlichen CRD-Untereinheiten und chimäre Galectine (Galectin-3) mit einer oder sogar mehreren CRD-Untereinheiten des gleichen Typs [20-22]. Galectine befinden sich hauptsächlich im Zytoplasma und unter bestimmten Bedingungen auch im Zellkern. Sie können jedoch auch sezerniert und somit außerhalb der Zellen wirken. Dementsprechend ist die Aufgabe und Funktion von Galectinen weitreichend und noch immer nicht vollständig geklärt. Das Spektrum reicht von der Bindung an Glykane auf der Zelloberfläche und an extrazelluläre Matrices, bis zur Beteiligung an intrazellulären Signalkaskaden durch Bindung an intrazelluläre Liganden [23-25]. In den letzten Jahren wurde intensiv an ihrer Rolle bei bestimmten inflammatorischen Erkrankungen und an ihrem Einfluss auf die Entwicklung, Progression und Metastasierung von Tumoren geforscht [23, 26-28].

Die Expression von Galectinen variiert in verschiedenen Krebszellen und häufig zeigen sich erhöhte Galectin-Expressionen [29]. Diese veränderten Galectin-Expressionsmuster korrelieren

häufig mit der Aggressivität des Tumors und der Prognose, beispielsweise findet man in vielen verschiedenen Tumorentitäten eine erhöhte Gal-1-Expression, welche oft ein ungünstigeres Outcome prognostiziert [29, 30]. Speziell bei Brustkrebs liegt der Studienfokus der letzten Jahre besonders auf Galectin-3 und Galectin-1 [30, 31]. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Galectin-1-Expression mit dem Tumor-Grading (Einteilung des histologischen Differenzierungsgrades des malignen Gewebes) festgestellt werden [26, 32]. *In vivo* wurden diese These untermauert durch den *knockdown* (Ausschaltung eines Gens) von Galectin-1 in einem Brustkrebs-Mausmodell, was zu einem verminderten Tumorwachstum, sowie zu geringerer Metastasierung führte [33]. Galectin-1 stellt somit einen möglichen Angriffspunkt für eine gezielte Brustkrebstherapie dar, welche aber bei aktuell noch nicht ausreichender Datenlage bisher nicht etabliert worden ist [34, 35]. Die Galectin-3 Expression zeigt in malignen Tumoren im Vergleich zu gesundem Brustgewebe veränderte Expressionsmuster und stellt somit einen prognostischen Wert dar [36-38]. Für Galectin-9 hingegen wurde eine antimetastatische Wirkung bei Brustkrebs auf Basis von immunhistochemischen Färbungen von humanen Präparaten und auch in Zellmodellen festgestellt [39].

Galectin-7 erregt schon seit einigen Jahren Aufmerksamkeit durch zahlreiche Funktionen in Zellverbänden mit intra- und extrazellulärer Wirkung und Beteiligung an verschiedenen Prozessen wie der Apoptose [40], Zellmigration und Zelladhäsion [41]. Auch in Bezug auf die Karzinogenese wird seit Jahren reichlich geforscht: Bei Lymphomen korrelierte die ektopische Expression von Galectin-7 nachweislich mit dem metastatischen Potenzial transplantierte Lymphomzellen [42]. Bei Melanomen wurde die Expression von Gal-7 festgestellt [43], und bei subkutaner Injektion von Melanomzellen in Mäuse wird Gal-7 sowohl im entstehenden Primärtumor als auch in Lungenmetastasen exprimiert [44]. Manche Karzinome werden mit einer verminderten Gal-7-Expression in Verbindung gebracht, wie Magen- [45], Urothel- [46] und Gebärmutterhalskrebs [47]. Im Gegensatz dazu exprimieren Plattenepithel- und Schleimhauttumoren von Kopf- und Halskrebs [48], Speiseröhre [49] und Schilddrüse [50] sowie Ovarialkarzinome (verbunden mit einem schlechten Gesamtüberleben (OS)) [51] höhere Gal-7-Werte als normales Gewebe.

Zu Galectin-7 liegen bereits einige Studien im Zusammenhang mit Brustkrebs vor, während zu Galectin-8 bisher keine ausreichende Datenlage besteht. Erste Ergebnisse stammen aus dem Jahr 1997, bei denen eine erhöhte Genexpression von Gal-7 in induzierten Brustkrebsgewebe in Tierversuchen nachgewiesen wurde [52]. Einige Studien bezogen auf Gal-7 deuten auf eine prognoseverschlechternde Wirkung von Gal-7-positiven Brustkrebszellen hin. Dabei zeigten vor allem HER2-positive Tumoren eine erhöhte Gal-7-Expression, sowie auch Tumoren mit vermehrter Lymphknotenmetastasierung. Diese Aussagen wurden in einem Mausmodell bestätigt [53, 54]. In einer weiteren Studie zu Gal-7 bei Brustkrebs wurde in einem Mausmodell ein erhöhtes Metastasierungsrisiko bei erhöhter Expression gezeigt und eine Resistenz der Gal-7 positiven Krebszellen gegenüber Apoptose beobachtet. Ein mögliche Interaktion von Gal-7 in den bekannten p53-Signalweg in Tumoren wurde ebenfalls beschrieben [55]. Zur Bedeutung von Gal-8 bei Brustkrebs zeigt eine andere Studie, dass die Ausschaltung eines Gal-8-abhängigen Signalweges zu verminderter Tumorprogression führt [56]. Gal-8 fungiert größtenteils als molekularer Anker, der die Zellmotilität und -adhäsion reguliert, da seine Bindung Integrin-vermittelte Signalkaskaden auslöst, die zu einer Neuordnung des Zytoskeletts und einer gerichteten Zellbewegung führen [57]. Diese Eigenschaften könnten eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von soliden Tumoren spielen. Erste Daten deuten auf ein besseres Überleben bei erhöhter Gal-8-Genexpression hin [58].

2.2.2 Siglecs

Siglecs (*Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*) sind eine Gruppe von I-Typ-Lektinen, die als Zellmembranproteine mit ihrem extrazellulären Anteil Sialinsäure enthaltende Glykan-Liganden binden [59]. Definitionsgemäß wurde 1998 erstmals die Untergruppe „Siglecs“ mit N-terminal Sialinsäure bindenden Domänen und C-terminal teils konservierten Signaldomänen beschrieben [60]. Es wird eine erste hochkonservierte Untergruppe, bestehend aus Siglec-1, -2 (CD22), -4 und -15, von einer zweiten Untergruppe unterschieden, zu welcher Siglec-3 (CD33) und weitere CD33-verwandte Siglecs (wie Siglec-5 und Siglec-8) gehören. Diese zweite Gruppe findet man häufig als Rezeptoren auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) exprimiert [18, 61]. Das Spektrum an Funktionen von Siglecs ist sehr weitreichend, dazu gehört sowohl die Ligandenerkennung, sowie -bindung im Rahmen von Zell-Zell-Interaktionen als auch eine wichtige Rolle bei der anschließenden intrazellulären Signalübertragung und Regulierung des Immunsystems [62]. Dementsprechend wurde mit der Entdeckung von Siglecs auch deren Einfluss auf die Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen erforscht, was sie außerdem interessant als Biomarker und potenzielle Angriffsstrukturen macht. Da Siglecs vor allem auf Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, B-Lymphozyten, Eosinophilen und Mastzellen exprimiert werden, wurde zunächst ihre Rolle bei Erkrankungen mit Einfluss ebendieser Zellen (z.B. beim schweren Asthma oder bei Lymphomen) untersucht [63]. Dabei wurden Siglecs als mögliche therapeutische Angriffspunkte erforscht, z.B. bei eosinophilen Magen-Darm-Erkrankungen [64, 65]. Einige Antikörper gegen Siglecs (wie Siglec-3 und -2), sind bereits zugelassen oder befinden sich in der klinischen Prüfung für die Behandlung von durch Immunzellen vermittelte Krankheiten u.a. auch gegen Leukämieformen und Lymphome [63, 66].

Siglecs und ihre Rolle bei verschiedenen Krebsarten, v.a. Blutkrebs, wurde in den letzten Jahren eingehend erforscht. CD22 und CD33 wurden als spezifische Marker schon vor der Entdeckung der Klasse der Siglecs als spezifische Marker von B-Zell-Lymphomen und myeloischen Leukämien entdeckt. Es wurde gezeigt, dass die angeborenen Immunreaktionen durch Siglec-exprimierende Immunzellen gegen Krebszellen reduziert werden kann, ausgelöst durch die Erkennung von Sialoglycan-Liganden auf Krebszellen selbst oder von Krebszellen produzierten löslichen Muzinen [63, 67]. Veränderungen der Sialinsäuren bei Krebszellen sind seit vielen Jahren bekannt und es wurden Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems identifiziert, die auf der Interaktion von Sialoglykanen mit immunregulatorischen Siglec-Rezeptoren beruhen, die sowohl von Tumorzellen als auch von Mikroorganismen ausgenutzt werden. Rezeptoren stellen somit interessante Angriffspunkte für eine Verbesserung der Krebstherapie dar [67-69]. Viele Forschungsarbeiten an Siglecs konzentrieren sich auf die autologe Immunabwehr gegen Krebszellen z.B. durch den Einfluss von tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) und ihrer Interaktion mit Tumorzellen. Beispielsweise führt eine Siglec-9 Aktivierung auf TAMs zu einer geringeren wachstumsfördernden Tumorumgebung, andererseits hemmte die Bindung von Siglec-9 durch tumorassoziierte Liganden die Bekämpfung von Tumorzellen [68]. In den letzten Jahren wurden onkologische Therapien durch den Einsatz sogenannter Immuncheckpoint-Inhibitoren (z.B. Antikörper gegen PD-L1 oder PD-1) revolutioniert [70, 71]. Immuncheckpoints sind ebensolche Signalwege, welche die Regulierung der Immunantwort beeinflussen und von Tumorzellen zur Vermeidung einer Erkennung durch das Immunsystem genutzt werden [72]. Siglecs könnten genau als solche Checkpoints in einer spezifischen Therapie fungieren und es wird derzeit an einer solchen Funktion geforscht [67].

Bezüglich des Einflusses von Siglecs auf gynäkologischen Tumoren, im Besonderen Brustkrebs, sind nur sehr wenige Daten bekannt. Laut ersten Daten aus „The Cancer Genome Atlas“ zeigen

gynäkologische Tumoren mäßige (z. B. Siglec-7 oder -9) oder auch hohe (z. B. Siglec-2 oder -10) RNA-Expression. Das könnte auf das Vorhandensein von Leukozyten-Untergruppen hindeuten, die durch die Hypersialylierung des Tumors infolge der erhöhten Sialyltransferasen-Expression und -aktivität potenziell gehemmt werden [73]. Die Wechselwirkungen zwischen Sialinsäuren und Siglecs können daher auch wichtige Auswirkungen auf die Immunabwehr und auf immuntherapeutische Strategien bei gynäkologischen Tumoren haben.

Es wurde gezeigt, dass Siglec-1 an einer autoregulatorischen Schleife zwischen TAMs und Krebszellen in aggressiven Brustkrebsarten beteiligt ist, wobei die Expression von Siglec-1 und C-C-Motiv-Chemokin-Ligand-8 (CCL8) zusammen als prognostische Marker für ein ungünstiges Outcome identifiziert wurden [74]. Darüber hinaus fördern Siglec-1-positive Makrophagen in der Tumormikroumgebung das Fortschreiten von TNBC zumindest teilweise, indem sie die Antitumorimmunität von T-Zellen gegen Brustkrebszellen hemmen [75].

Siglec-8 wird hauptsächlich von Eosinophilen und Mastzellen [76] und in geringen Mengen auch von Basophilen [64] exprimiert und wurde als einer der ersten Eosinophilen-spezifische Transmembranrezeptoren identifiziert [77]. Antikörper gegen Siglec-8 auf Eosinophilen führen zur selektiven Apoptose dieser Zellen; auf menschlichen Mastzellen hingegen zu einer Hemmung der Degranulation und somit zu einer geringeren Histaminausschüttung, so auch in chronisch entzündeten Atemwegen [76, 78, 79]. Bei Eosinophilen kann durch Interleukin-5 (IL-5) die Expression von Siglec-8 auf der Oberfläche hochreguliert werden und die Aktivierung von IL-5 kann zu einer Verstärkung der durch Siglec-8 vermittelten Apoptose führen [80]. Auch Interleukin-33 kann die durch Siglec-8 vermittelte Apoptose verstärken und synergistisch mit IL-5 agieren, was eine wichtige Rolle bei eosinophil vermittelten Erkrankungen spielt [81, 82]. Diese Eigenschaften machen Siglec-8 zu einem geeigneten *target* für die Behandlung von Eosinophilen- und Mastzell-abhängigen Krankheiten wie Asthma, chronischer Rhinosinusitis, chronischer Urtikaria, hypereosinophiler Syndrome und eosinophiler Magen-Darm-Erkrankungen [83, 84]. Der klinische Einsatz von Siglec-8-Antikörpern für die Behandlung von allergischen Erkrankungen wird bereits erprobt [85]. Es wurden auch Auto-Antikörper gegen Siglec-8 in venösen Immunglobulinpräparaten, welche zur Behandlung von Autoimmun- und allergischen Erkrankungen eingesetzt werden, gefunden, die Hinweise auf eine anti-autoimmune Regulation geben [68, 83].

Über Siglec-8 und dessen Rolle in der Tumorbilogie ist bisher nur wenig bekannt. Es wurde als Spätreifungsflächenmarker auf Eosinophilen und Basophilen bei Patient*innen mit chronisch eosinophiler Leukämie, chronisch myeloischer Leukämie und auf malignen und nicht-malignen Mastzellen im Knochenmark nachgewiesen [86]. Bei der Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom wurde nach Radiotherapie im Rahmen einer induzierten Immunabwehr im bestrahlten Gebiet eine Invasion von Siglec-8 exprimierenden Eosinophilen beobachtet [87].

Begrenzte Daten liegen auch für das klarzellige Nierenkarzinom und für Magenkrebs vor. Die (mittels IHC gemessene) Siglec-8-Expression wurde als potenzieller unabhängiger prognostischer Biomarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom identifiziert, wobei eine hohe Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben (OS) und einer kürzeren Zeitspanne bis zur Diagnose einer Metastasierung (DDFS) korrelierte [88]. Im Gegensatz dazu war eine niedrige Siglec-8-Expression ein unabhängiger schlechter prognostischer Faktor für das OS bei Patient*innen mit Magenkrebs nach chirurgischer Resektion. Dies galt insbesondere für höhere TNM-Stadien, und die Autoren schlugen vor, dass eine niedrige Siglec-8-Expression als Marker zur Identifizierung von Patient*innen dienen könnte, die aggressivere adjuvante Therapien benötigen [89].

Die Zielsetzung im Rahmen meiner Forschungsarbeit war die Generierung erster Daten zur Expression und der Rolle von Siglec-8 in der Tumorbilogie von Brustkrebs

3. Zusammenfassung

In der Zusammenfassung werden Untersuchungsergebnisse meiner Arbeiten beschrieben und diskutiert. Dabei wird auf die Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet und auf mögliche Limitationen eingegangen, und ein Ausblick auf potenzielle künftige Entwicklungen gegeben. Bezüglich genauer Angaben zu detaillierten Ergebnissen und zur Diskussion der einzelnen Studien wird auf die entsprechenden Originalarbeiten verwiesen, welche an entsprechender Stelle zitiert werden und sich im Anhang befinden.

3.1 Angewandte Forschungsmethoden

Ziel meiner Forschungsarbeiten war, Galectine (Gal-2, Gal-7 und Gal-8) und Siglecs als prognostische Faktoren, bzw. Angriffspunkte bei Therapien in einem ausgewählten Kollektiv an Brustkrebspatientinnen der Frauenklinik der Universität München zu untersuchen. Das untersuchte Kollektiv umfasst 235 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Brustkrebsproben. Bei allen Patientinnen wurde ein primäres, nicht metastasiertes Mammakarzinom zwischen 1998 und 2000 an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München diagnostiziert und operiert. Klinische und pathologische Daten sowie Daten zur Nachbeobachtung (bis zu zehn Jahren) wurden aus den Krankenakten der Patientinnen und aus dem Münchner Krebsregister entnommen. Der histopathologische Subtyp (kein spezifischer Typ (NST) vs. Nicht-NST), das Tumor-Grading (G1-3) nach den Kriterien von Elston und Ellis (1993) [7-9] und das Stadium nach dem TNM-System [6] (T für Tumorgröße, N für den Lymphknotenstatus und M für Metastasierung) wurden in der gynäkologischen Pathologie bestimmt.

Die Untersuchung des eingebetteten Gewebes erfolgte zunächst mittels immunhistochemischen Färbungen der besagten Proteine (zunächst Gal-2, Gal-7 und Gal-8, dann Siglec-8) und der Ermittlung des semiquantitativen immunoreaktiven Scores (IRS, Remmele und Stegner 1987, [90]). Der Score wurde optisch durch Multiplikation der vorherrschenden Färbeintensität (0: keine; 1: gering; 2: mäßig; 3: stark) und des Prozentsatzes der positiv gefärbten Krebszellen (0 = 0%, 1 = 1-10%, 2 = 11-50%, 3 = 51%-80% und 4 = 81%-100% gefärbte Zellen) ermittelt. Der IRS wurde separat im Zytoplasma und im Zellkern der Krebszellen bestimmt. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung mittels *SPSS Statistics 25*: Korrelationen wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten von Spearman getestet, Gruppenvergleiche hinsichtlich des IRS zwischen verschiedenen klinischen und pathologischen Untergruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test getestet und als Boxplot-Diagramme dargestellt. Die Überlebenszeiten zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mittels Kaplan-Meier-Analysen verglichen, und die Unterschiede wurden mit Log-Rank-Tests (Mantel-Cox), auf Signifikanz geprüft. Zur Bestimmung der Unabhängigkeit der prognostischen Faktoren wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Nach Auswertung dieser Ergebnisse, erfolgte für die Daten aus den Galectinfärbungen eine Immunfluoreszenzfärbung zur näheren Charakterisierung von bestimmten Gal-7 exprimierenden Zellen. In der weiterführenden Arbeit für die Untersuchung von Siglec-8 wurde das Protein in Zellkulturversuchen untersucht. Dabei wurden die verschiedenen Brustkrebszelllinien (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) mit β -Estradiol oder Rosiglitazone stimuliert oder ein *knockdown* von Siglec-8 durchgeführt. Anschließend wurden mRNA-Levels von Siglec-8 und Gal-7 mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt und auf Proteinebene wurde ein Western Blot für Siglec-8 durchgeführt.

3.2 Paper I: Ergebnisse und Diskussion

Galectine sind nachweislich ein zentraler Faktor bei der Karzinogenese [28, 38, 42]. Ihre Bedeutung bei Brustkrebs ist noch nicht ausreichend erforscht. In meinem Kollektiv an Brustkrebs zeigte sich in der IHC eine nur spärliche Expression von Gal-2 und ein prognostischer Nutzen wurde statistisch nicht nachgewiesen. Somit wurden diese Forschungsarbeiten zunächst auf Gal-7 und Gal-8 fokussiert, wobei sich vor allem Gal-7 als ein sehr vielversprechender prognostischer Faktor und möglicher Angriffspunkt in der Brustkrebstherapie herausstellte, an dem weitere Forschung betrieben werden sollte.

In dieser Promotionsarbeit wurde gezeigt, dass die Gal-7 und Gal-8-Expression im Zytoplasma positiv mit dem HER2-Status korreliert, also bei HER2-positiven Karzinomen eine deutlich höhere Galectinexpression vorliegt. Gal-7 ist bei NST-Tumoren, sowie bei PR-negativen Tumoren signifikant höher exprimiert. Zudem wurde eine signifikant erhöhte Gal-7-Expression in weniger gut differenzierten Zellen, also bei höherem *Grading* beobachtet, während die Gal-8-Expression in gut differenzierten Zellen am höchsten ist, also bei niedrigem *Grading*. Es wurde gezeigt, dass Gal-7 auch in Makrophagen neben den Tumorzellen vorhanden ist. Eine erhöhte Gal-7 Expression wurde mittels Immunofluoreszenz bei niedrigem *Grading* bei den Tumor umgebenden Makrophagen beobachtet. Eine hohe Gal-7-Expression im Zytoplasma wurde als ein signifikanter unabhängiger prognostischer Marker für ein schlechtes progressionsfreies Überleben ($p = 0,017$) in der Gesamtkohorte und mit grenzwertiger Signifikanz auch in der HER2-positiven Untergruppe identifiziert. Tumoren mit hoher Gal-8-Expression im Zytoplasma zeigten ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben ($p = 0,032$). Die Kombination aus hoher Gal-7-Expression und niedriger Gal-8-Expression zeigte schlechte Überlebensdaten: Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Kombination von Gal-7- und Gal-8-Expression die prognostische Genauigkeit weiter verbessern kann. Es erfolgte die Einteilung der Kohorte in zwei verschiedene Gruppen: eine kleine Gruppe (hohe Gal-8-, niedrige Gal-7-Expression) mit einem sehr guten Ergebnis und eine zweite Gruppe (hohe Gal-7-, niedrige Gal-8-Expression) mit einem ungünstigeren Outcome. [1]

Gal-7 scheint ein negativer prognostischer Faktor für das klinische Ergebnis bei Brustkrebs zu sein [41], dies zeigte Demers et al [53] sowie Grosset et al [91], und stimmt auch mit den für diese Arbeit erhobenen Daten überein [1]. Grosset et als [54] Daten weisen auf einen Zusammenhang von einer starken Gal-7-Expression und einer vermehrten HER-2-Positivität bei Brustkrebs hin. Auch in dieser Promotionsarbeit wurde eine starke Assoziation zwischen einer hohen Gal-7-Expression im Zytoplasma und der HER2-Amplifikation festgestellt. Zudem zeigten HER2-positiven Tumoren mit hoher Gal-7-Expression eine schlechtere Prognose [1]. Das deutet darauf hin, dass möglicherweise eine funktionelle Verbindung zwischen Gal-7 und HER2 bestehen könnte, und HER2-positive Tumoren für eine mögliche Behandlung mit Gal-7 als Angriffspunkt besonders interessant sein könnten. Letztens wurde gezeigt, dass Gal-3 den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), welcher zur Familie der ErbB-Rezeptoren, wie auch HER2, gehört, modifiziert, der das Zellwachstum und -überleben in normalem und krebsartigem Gewebe reguliert [92-94]. Bis jetzt wurde nur für Gal-3 eine funktionelle Verbindung zwischen Galectinen und ErbB-Rezeptoren nachgewiesen, eine Verbindung zu Gal-7 wäre möglich.

In dieser Arbeit war die Gal-8-Expression mit einem besseren OS assoziiert [1], ähnliche Ergebnisse beobachtete auch Grosset et al [91]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen den Vorteil einer erhöhten prognostischen Genauigkeit einer Kombination beider Marker (Gal-7 und Gal-8) [1]. Ähnliche Effekte wurden für Galectin-Liganden nachgewiesen: Bei Brustkrebspatientinnen wurden hohe Konzentrationen von Gal-1-Liganden und niedrige Konzentrationen von Gal-8-Liganden beobachtet, was ihr Verhältnis zu einem starken Marker für Brustkrebs macht [95]. In dieser

Promotionsarbeit wurde eine erhöhte Gal-7 Expression in den Tumor umgebenden Makrophagen beobachtet [1]. Tumor infiltrierende Makrophagen scheinen auch als therapeutische Strategien immer wichtiger zu werden, und Gal-7 spielt bei diesen auch beim Gebärmutterhalskrebs eine entscheidende Rolle [96, 97].

Was die Mechanismen der Regulierung der Galectin-Expression und der Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma angeht, so ist es wichtig zu berücksichtigen, dass Gal-7 auch extrazellulär bereitgestellt wird: Das extrazelluläre Gal-7 steuert den intrazellulären Pool von Gal-7, zum einen durch eine Erhöhung der Gentranskription (mRNA-Expression), zum anderen durch einen Re-Entry-Weg in die Zellen von extra- nach intrazellulär [98]. In ähnlicher Weise wurde für Gal-1 (das zur gleichen Gruppe wie Gal-7 gehört) ein Transfer von extrazellulär in den Zellkern nachgewiesen, und die Anhäufung von Gal-1 im Zellkern fördert die epitheliale Invasivität beim Mammakarzinom [99]. In dieser Promotionsarbeit wurde beobachtet, dass Gal-7 auch in Makrophagen neben den Tumorzellen vorhanden ist. Daher könnten diese Makrophagen auch eine Quelle für extrazelluläres Gal-7 für Tumorzellen darstellen und den intrazellulären Gal-7-Pool regulieren. Tumor-assoziierte Makrophagen werden mit schlechten Überlebensraten bei Brustkrebs in Verbindung gebracht [100], was Gal-7 als therapeutisches Ziel noch interessanter macht. Vor allem bei Brustkrebs wurde die Genregulierung von Gal-7 über Transkriptionsfaktoren schon weiterführend erforscht. Die Expression von Gal-7 wird von p53 beeinflusst und noch weitere Signalwege scheinen eine Rolle zu spielen, so scheint CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) als Transkriptionsfaktor zu einer Gal-7-Genaktivierung zu führen [55, 101]. Zu den funktionellen Effekten, die für Gal-8 beschrieben wurden, gehören die Aktivierung des aktivierten Leukozyten-Zelladhäsionsmoleküls (ALCAM) [55, 102, 103] und die Aktivierung des endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)-Signalwegs auf Endothelzellen [104]. Diese Wege beschreiben jedoch alle ein tumorförderndes Potenzial von Gal-8, während Gal-8 sich in dieser Arbeit als ein positiver prognostischer Faktor herausstellte. Daher gibt es möglicherweise noch andere tumorsuppressive Signalwege, die weiter untersucht werden müssen, vor allem in Bezug auf die Isoformen von Gal-8 und den unterschiedlichen Affinitäten der Kohlenhydratbindungsspezifität [105]. Gal-8 wurde als löslicher Faktor identifiziert, der von lymphatischen Endothelzellen freigesetzt wird und Podoplanin exprimierende Makrophagen anlockt. Dabei kann es zur Interaktion auf Makrophagenoberflächen kommen, welche die Lymphangiogenese bei Brustkrebs fördert, was wiederum einen prognostisch negativen Einfluss beschreibt [106].

Der therapeutische Nutzen von Gal-7 wurde schon bei einigen Krankheitsbildern erprobt: Exogen zugeführtes Gal-7 wurde bereits erfolgreich zur Reparatur von Hornhautverletzungen von Mäusen eingesetzt. Im Gegensatz dazu muss der Einsatz von Gal-7-Inhibitoren bei Tumoren getestet werden, bei denen seine Expression mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist, wie Brustkrebs. Diese könnten auch selektiv nur auf intrazelluläre oder extrazelluläre Funktionen von Gal-7 abzielen, um nur bestimmte Prozesse zu hemmen [41]. Erste Versuche, Galectine bei Brustkrebs gezielt zu bekämpfen, wurden bereits unternommen: Grosset et al. hat gezeigt, dass die gezielte Beeinflussung des CRD-unabhängigen zytosolischen Gal-7 in Brustkrebszellen und damit die Beeinträchtigung der p53-Funktionen eine wertvolle Strategie für die Behandlung von Brustkrebs sein könnte [102]. Der Einsatz von Gal-8 ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Ausschaltung von Gal-3 erhöht die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber dem apoptotischen Wirkstoff Arsenitrioxid (ATO, der bereits von der US Food and Drug Administration für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie zugelassen ist) [37], was Gal-3 zu einem interessanten therapeutischen Ziel macht. Ein oral verabreichter Gal-3-Antagonist wurde bereits in einem Mausmodell untersucht und führte zu einem geringeren Wachstum von Lungenadenokarzinomen [103]. Außerdem wurde ein Gal-1-Inhibitor entdeckt, der eine synergistische Wirkung mit dem

Chemotherapeutikum Paclitaxel bei Brustkrebs zeigt [104]. Da Gal-7 zur gleichen Familie wie Gal-1 gehört, könnte ein ähnliches therapeutisches Potenzial für Gal-7 bestehen.

3.3 Paper II: Ergebnisse und Diskussion

Die Rezeptorfamilie der Siglecs ist vor allem für ihre Rolle bei immunbedingten Krankheiten bekannt und derzeit gibt es nur sehr wenige Daten über die Rolle von Siglecs auf Tumorzellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf eine mögliche Rolle der Siglec-8-Expression bei Brustkrebs gesammelt [2]. Bis jetzt wurde nur in zwei Studien die Expression von Siglec-8 bei soliden Krebserkrankungen mittels IHC bestimmt (bei Nieren- und Magenkrebs [88, 89]), wobei beide ähnliche Expressionsmuster wie in den Brustkrebsproben zeigten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass höhere Siglec-8-Expressionswerte mit höherem *Grading* einhergehen, was darauf hindeutet, dass die Siglec-8-Expression bei der Entdifferenzierung von Tumorzellen induziert werden könnte. Die Siglec-8-Expression ist bei ER-positiven Tumoren signifikant höher als bei ER-negativen Tumoren und bei TNBC am niedrigsten [2]. Siglec-8 wurde in Bezug auf Überlebensdaten nicht als prognostischer Faktor identifiziert. Die Siglec-8-Expression korreliert jedoch mit den zuvor identifizierten prognostischen Faktoren Gal-7 (negativer prognostischer Faktor [1]). Bei der Auswertung dieser prognostischen Faktoren im Zusammenhang mit der Siglec-8-Expression wurde gezeigt, dass eine hohe Gal-7-Expression in der Untergruppe mit hoher Siglec-8-Expression mit einem schlechteren PFS verbunden ist und die Kombination beider Faktoren somit eine prognostische Relevanz zeigt. Die Daten dieser Studie deuten auf einen Zusammenhang zwischen Siglec-8 und prognostischen Faktoren, wie Gal-7, bei Brustkrebs hin. Für diese Arbeit wurde in Zellkulturexperimenten versucht eine Abhängigkeit der beiden Faktoren aufzufindig zu machen, wobei der *knockdown* von Siglec-8 in der Zellkultur zu einer reduzierten Gal-7-Expression auf mRNA-Ebene führte, was auf eine Interaktion dieser beiden Proteine hindeutet [2]. Eine mögliche Interaktion dieser beiden Proteine ist in der Literatur bisher noch nicht zu finden. In GeneCards wird bisher nur eine Interaktion von Gal-3 mit Siglec-8 auf genetischer Ebene beschrieben [107]. Die Höhe der Expression von Gal-7 in Tumorzellen wird von unterschiedlichen Mechanismen beeinflusst. Dabei reguliert der intrazelluläre Spiegel von Gal-7 unter anderem auch selbst die Höhe der Gal-7-mRNA-Expression [98]. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass ein von mir in der Zellkultur durchgeführter *knockdown* von Siglec-8 zu einer verringerten mRNA-Expression von Gal-7 führt. N-Acetyllactosamine (LacNAc)-Epitope binden bekanntlich an Galectine wie Gal-1, Gal-3 und Gal-7 [108]. Für Gal-1 wurde eine wichtige Rolle der LacNAcs bei der Übertragung von extrazellulär nach intrazellulär nachgewiesen: extrazelluläre Glykane mit LacNAc-Epitopen, binden Gal-1 und fangen es so extrazellulär ab. Eine α -2,6-Sialylierung dieser LacNAc-Epitope hemmt die Bindung von Gal-1 und bewirkt den Transfer nach intrazellulär und den anschließenden nukleären Transfer von Gal-1 [99]. Ein ähnlicher Mechanismus besteht womöglich auch für Gal-7. Möglicherweise spielt Siglec-8 in diesem Transfer eine Rolle, da bekannt ist, dass es sialylierte LacNAcs binden kann [109]. Auf diese Weise könnte Siglec-8 sialylierte extrazelluläre LacNAc-Epitope stabilisieren und die Freisetzung von extrazellulär gebundenem Gal-7 fördern, das dann wieder nach intrazellulär übertragen werden könnte. Auf diese Vermutungen müssen jedoch weitere Funktionsanalysen folgen, um die vorgeschlagenen Interaktionen gründlich zu analysieren und zu bestätigen.

Die spezifische Hemmung von Siglec-8 könnte zusätzlich zu endokrinen Therapien bei bestimmten Brustkrebstumorarten eine therapeutische Strategie sein. Interessanterweise wird schon lange ein Anti-CD33 (= Siglec-3)-Antikörper als Teil eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugats für die

Behandlung der akuten myeloischen Leukämie untersucht und ist auch als Wirkstoff zugelassen [110]. Mehrere antikörperbasierte Therapien befinden sich mittlerweile in der klinischen Erprobung für die Behandlung von Lymphomen/Leukämien und Autoimmunerkrankungen [111].

Weitere Untersuchungen in der Zellkultur im Rahmen dieser Promotionsarbeit, wie die Stimulation mit Östradiol hatten keinen Einfluss auf die Siglec-8-mRNA-Expression. Stimulation mit einem PPAR γ -Agonisten (Rosiglitazone) hingegen führte zu einer stabilen mRNA-Erhöhung von Siglec-8 [2]. In GeneCards [107] ist eine PPAR γ -Bindungsstelle im Transkriptionsfaktor des Siglec-8-Genpromotors beschrieben, was die Wechselwirkung erklären könnte. Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ (PPAR γ) ist ein durch Liganden aktivierter nuklearer Hormonrezeptor, der als Transkriptionsfaktor fungiert und bei vielen Tumorarten, darunter auch bei Brustkrebs, überexprimiert ist [112, 113]. Die Wirkungen von PPAR γ -Liganden bei Brustkrebs sind noch nicht vollständig geklärt, aber Daten deuten darauf hin, dass Liganden wie Rosiglitazone die Proliferation hemmen und die Apoptose induzieren [114]. Rosiglitazone wurde in klinischen Studien untersucht [115], ohne jedoch einen Durchbruch zu erzielen [116]. Die Wirksamkeit der PPAR γ -Therapie könnte durch ein besseres Verständnis der an verwandten Signalwegen beteiligten Proteine, wie Siglec-8, verbessert werden. Es wird davon ausgegangen, dass Siglec-F bei Mäusen das Äquivalent zu Siglec-8 beim Menschen ist [117]. Daher könnten Experimente in vivo-Mausmodellen durchgeführt werden, um die Wirkung zu erproben.

Die Rolle von Siglecs in Tumoren, einschließlich möglicher therapeutischer Angriffspunkte, wird derzeit untersucht. Die Forschung konzentriert sich auf die Rolle von Siglecs als zielgerichtete Immun-Checkpoints [67]. Es wurde festgestellt, dass die CD33-Gruppe von Siglecs eine wichtige Rolle als Immun-Checkpoint-Moleküle in der Tumor-Mikroumgebung von Brustkrebs spielt: Die Hemmung von Siglec-7 (das auf Eosinophilen und natürlichen Killerzellen (NK) exprimiert wird) könnte die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen auslösen [118]. Siglec-9 wird auf TAMs exprimiert und interagiert nachweislich mit MUC1 auf Tumorzellen [119, 120]. Darüber hinaus exprimieren TAMs hohe Mengen an Siglec-10, das mit CD24 interagiert. CD24 kann der dominierende angeborene Immun-Checkpoint bei Eierstockkrebs und TNBC sein und ist ein vielversprechendes Ziel für die Krebsimmuntherapie [121]. Siglec-1 (=CD169) fungiert als Adhäsionsmolekül und kann die Erkennung und Internalisierung von mit Sialinsäure bestückten Tumorzellteilen erleichtern. Somit kann CD169 an der Endozytose von Vesikeln, die von Tumoren gebildet werden, beteiligt sein und es Makrophagen ermöglichen, entweder den Inhalt abzubauen oder die Aufnahme, Verarbeitung und Präsentation zu verbessern, um die Immunaktivierung zu steigern [122]. Hierbei wird bereits die spezifische Ansteuerung von Siglec-1 auf der Oberfläche von Lymphknoten-Sinusmakrophagen zur Verbesserung einer antitumoralen Immunantwort erprobt [123]. CD169-positive Makrophagen spielen auch bei Brustkrebs eine wichtige Rolle und könnten als wichtige Marker genutzt werden [124]: Sie unterstützen das Tumorwachstum und die Metastasierung und die Untersuchung abhängiger Signalwege scheint essenziell zur therapeutischen Unterstützung der Immunantwort [75, 125]. Siglec-15 wird auf tumorassoziierten Makrophagen und von einigen Tumoren exprimiert, wo es vermutlich zur immunsuppressiven Mikroumgebung beiträgt, beispielsweise über Produktion von TGF- β [126]. Siglec-15, das auf Antigen-präsentierenden Zellen als Inhibitor der T-Zell-Aktivierung identifiziert wurde, wird in einer frühen klinischen Studie bei fortgeschrittenen soliden Tumoren mittels eines Antikörpers erprobt. Siglec-15 wurde an HER2-Antikörper gekoppelt und eine NK-Zell-vermittelte Abtötung von Tumorzellen wurde getestet [127].

Alle diese Studien befassen sich mit dem Einfluss von Siglecs auf Immunzellen in der Mikroumgebung des Tumors. Im Gegensatz dazu konzentrierte sich diese Promotionsarbeit auf die Rolle

von Siglec-8 auf dem Tumor selbst und liefert erste Hinweise auf eine Rolle der Siglec-8-Expression bei Brustkrebs. In weiteren Studien müssen funktionelle Aspekte geklärt werden, um seine Rolle als mögliches therapeutisches Ziel zu bewerten.

3.4 Stärken und Limitationen

Die Aussagekraft dieser Arbeit stützt sich auf die Datenerhebung an einem großen, breiten Probenkollektiv mit langem Nachverfolgungszeitraum. Dennoch müssen die Daten mit Vorsicht interpretiert werden, da mittlerweile neue spezifische Therapiekonzepte (z.B. HER2-Antikörper) die Überlebensdaten signifikant beeinflusst haben und sich deutlich von denen vor 20 Jahren (Zeitpunkt der Sammlung des Kollektivs) unterscheiden. *In vivo* Studien und weitere Datenerhebungen mit mehr Zelllinien (beispielsweise HER2-positive Brustkrebszellen) und mit Makrophagen sind notwendig, um die Aussagekraft dieser Arbeit zu stärken und die Daten im Kontext heutiger Therapiemöglichkeiten besser zu verstehen.

4. Abstract

In the abstract, the research results and their significance for the field as well as possible limitations of my work are discussed, and an outlook on potential future developments is given. For more detailed results and discussions of the individual studies, reference is made to the corresponding original papers, which are cited at the respective places and can be found in the appendix.

4.1 Applied Research Methods

The aim of my research was to investigate Galectins (Gal-2, Gal-7, and Gal-8) and Siglecs as prognostic factors or targets of therapies in a selected collective of breast cancer patients. The investigated collective comprises a panel of 235 formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer specimens. All patients were diagnosed with and underwent surgery for primary, non-metastatic breast cancer between 1998 and 2000 at the Department of Gynecology and Obstetrics at Ludwig-Maximilians-University of Munich. Clinical and pathological data as well as follow-up data (up to ten years) were obtained from the patients' medical records and from the Munich Cancer Registry. Histopathologic subtype (no specific type (NST) vs. non-NST), tumor grading (G1-3) according to Elston and Ellis (1993) criteria [7-9] and staging according to the TNM system [6] (T for tumor size, N for lymph node status, and M for metastasis) were determined in gynecologic pathology.

The embedded tissue was first examined by immunohistochemical staining (IHC) of the proteins (initially Gal-2, Gal-7 and Gal-8, then Siglec 8) and by determination of the semiquantitative immunoreactive score (IRS, Remmele and Stegner 1987, [90]) using a Leitz Diaplan microscope (Leitz, Wetzlar, Germany). The score was obtained by multiplying the predominant staining intensity (0: none; 1: low; 2: moderate; 3: high) and the percentage of positively stained cancer cells (0 = 0%, 1 = 1-10%, 2 = 11-50%, 3 = 51%-80%, and 4 = 81%-100% stained cells). IRS was determined separately in the cytoplasm and nucleus of the cancer cells. Subsequently, statistical analyses were performed using SPSS Statistics 25: correlations were tested with Spearman's rank correlation coefficient, group comparisons regarding IRS between different clinical and pathological subgroups were tested with the Kruskal-Wallis test and presented as boxplot diagrams. Survival times between the different groups were compared using Kaplan-Meier analyses, and differences were tested for significance using log-rank tests (Mantel-Cox). Cox regression analyses were performed to determine the independence of prognostic factors. After evaluation of these results, immunofluorescence staining was performed to further characterize specific Gal-7 expressing cells. In the following work for the study of Siglec-8, the protein was studied in cell culture experiments. The different breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) were stimulated with β -estradiol or Rosiglitazone or a knockdown of Siglec-8 was performed. Subsequently, mRNA levels of Siglec-8 and Gal-7 were determined by quantitative real-time PCR, and at the protein level, a Western blot was performed for Siglec-8.

4.2 Paper I: Results and Discussion

Galectins have been shown to be a central factor in carcinogenesis [28, 38, 42]. Their significance in breast cancer has not yet been adequately explored. In my breast cancer panel, IHC showed sparse expression of Gal-2 and a prognostic benefit was not statistically demonstrated. Thus, this

research was initially focused on Gal-7 and Gal-8, with Gal-7 particularly emerging as a very promising prognostic factor and potential target in breast cancer therapy for further research.

In this thesis, it was shown that Gal-7 and Gal-8 expression in the cytoplasm positively correlates with HER2 status, i.e., in HER2-positive carcinomas there is a significantly higher expression of Galectin. Gal-7 is significantly higher expressed in NST tumors, as well as in PR-negative tumors. In addition, significantly increased Gal-7 expression was observed in less differentiated cells (higher grading), while Gal-8 expression was highest in well-differentiated cells (low grading). Gal-7 was also shown to be present in macrophages adjacent to tumor cells. Increased Gal-7 expression was observed in tumor-surrounding macrophages at low grading. High Gal-7 expression in the cytoplasm was identified as a significant independent prognostic marker for poor progression-free survival ($p = 0.017$) in the overall cohort and with borderline significance also in the HER2-positive subgroup. Tumors with high Gal-8 expression in the cytoplasm showed significantly improved overall survival ($p = 0.032$). The combination of high Gal-7 expression and low Gal-8 expression showed poor survival data: The results of this work suggest that the combination of Gal-7 and Gal-8 expression may further improve prognostic accuracy. The cohort was divided into two different groups: a small group (high Gal-8-, low Gal-7-expression) with a very good outcome and a second group (high Gal-7-, low Gal-8-expression) with a poor outcome. [1]

Gal-7 appears to serve as a negative prognostic factor for clinical outcome in breast cancer [41], this was shown by Demers et al. [53] and Grosset et al. [91] and is consistent with the data collected for this work [1]. Grosset et al. [54] showed a correlation of strong Gal-7 expression and increased HER2 positivity in breast cancer. A strong association between high Gal-7 expression in the cytoplasm and HER2 amplification was also found in this work. In addition, HER2-positive tumors with high Gal-7 expression showed a poorer prognosis [1]. This suggests that there may be a functional connection between Gal-7 and HER2. HER2-positive tumors may be of particular interest for potential treatment with Gal-7 as a target. Recently, Gal-3 has been shown to modify the epidermal growth factor receptor (EGFR), which is a member of the ErbB receptor family, like HER2. EGFR regulates cell growth and survival in normal and cancerous tissues [92-94]. To date, only Gal-3 has been shown to be functionally connected to ErbB receptors, and a similar connection to Gal-7 could be possible.

In this work, Gal-8 expression was associated with better overall survival[1], similar results were observed by Grosset et al. [91]. The results of this work show the advantage of increased prognostic accuracy by a combination of both markers (Gal-7 and Gal-8) [1]. Similar effects have been demonstrated for Galectin ligands: High levels of Gal-1 ligands and low levels of Gal-8 ligands were observed in breast cancer patients, making their ratio a strong marker for breast cancer [95]. In this work, increased Gal-7 expression was observed in tumor surrounding macrophages (TAMs) [1]. Tumor infiltrating macrophages could become increasingly important as therapeutic strategies, and, in this context, Gal-7 plays a crucial role also in cervix cancer [96, 97].

Regarding the mechanisms of regulation of Galectin expression and distribution between nucleus and cytoplasm, it is important to consider that Gal-7 is also provided extracellularly: Extracellular Gal-7 controls the intracellular pool of Gal-7, both by increasing gene transcription (mRNA expression) and by a re-entry pathway into cells from extracellular to intracellular[98]. Similarly, Gal-1 (which belongs to the same group as Gal-7) has been shown to be transferred from extracellular to the nucleus, and the accumulation of Gal-1 in the nucleus promotes epithelial invasiveness in breast cancer [99]. In this work, Gal-7 was observed to be present in macrophages adjacent to tumor cells. Therefore, these macrophages could also be a source of extracellular Gal-7

for tumor cells and regulate the intracellular Gal-7 pool. Tumor-associated macrophages are associated with poor survival rates in breast cancer [100], making Gal-7 even more interesting as a therapeutic target. Notably, in breast cancer, gene regulation of Gal-7 via transcription factors has been further explored. Gal-7 expression is influenced by p53 and other signaling pathways seem to play a role: CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) as a transcription factor could lead to Gal-7 gene activation [55, 101]. Functional effects described for Gal-8 include activation of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) [55, 102, 103] and activation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway on endothelial cells [104]. However, these pathways all describe a tumor-promoting potential of Gal-8, whereas Gal-8 was found to be a positive prognostic factor in this work. Therefore, there may be other tumor suppressive pathways that need to be further investigated, especially in relation to the isoforms of Gal-8 and the different affinities of the carbohydrate binding specificity [105]. Gal-8 has been identified as a soluble factor released by lymphatic endothelial cells that attracts podoplanin-expressing macrophages. This may result in interaction on macrophage surfaces that promotes lymphangiogenesis in breast cancer, which in turn describes a negative prognostic influence [106].

The therapeutic value of Gal-7 has already been tested in different pathologies: exogenously supplied Gal-7 has already been successfully used to repair corneal lesions in mice. In contrast, the use of Gal-7 inhibitors needs to be tested in tumors where its expression is associated with an unfavorable prognosis, such as breast cancer. These could selectively target only intracellular or extracellular functions of Gal-7 to inhibit specific processes [41]. Initial attempts to target Gal-7 in breast cancer have been made: Grosset et al. has shown that targeting the CRD-independent cytosolic Gal-7 in breast cancer cells, thereby affecting p53 functions, could be a valuable strategy for the treatment of breast cancer [102]. The use of Gal-8 has not yet been investigated. Knockdown of Gal-3 increases the sensitivity of tumor cells to the apoptotic agent arsenic trioxide (ATO, which is already approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of acute myeloid leukemia) [37], making Gal-3 an interesting therapeutic target. An orally administered Gal-3 antagonist has already been studied in a mouse model and resulted in reduced growth of lung adenocarcinomas [103]. In addition, a Gal-1 inhibitor was discovered to show a synergistic effect with the chemotherapeutic agent Paclitaxel in breast cancer [104]. Since Gal-7 belongs to the same family as Gal-1, there may be similar therapeutic potential for Gal-7.

4.3 Paper II: Results and Discussion

Siglecs are best known for their role in immune-related diseases and currently there is very little data on their role in tumor cells. In this work, first evidence for a possible role of Siglec-8 expression in breast cancer was collected [2]. To date, only two studies have determined the expression of Siglec-8 in solid cancers by IHC (in renal and gastric cancers [88, 89]), both showing similar expression patterns as in breast cancer samples.

In this work, it has been shown that higher Siglec-8 expression levels are associated with higher grading, suggesting that Siglec-8 expression may be induced during tumor cell dedifferentiation. Siglec-8 expression is significantly higher in ER-positive tumors than in ER-negative tumors and lowest in TNBC [2]. Siglec-8 has not been identified as a prognostic factor in terms of survival data. However, Siglec-8 expression correlates with previously identified prognostic factor Gal-7 (negative prognostic factor [1]). In conjunction with Siglec-8 expression, it was shown that high Gal-7 expression was associated with worse PFS in the subgroup with high Siglec-8 expression, and thus the combination of both factors showed prognostic relevance. The data from this study

suggest an association between Siglec-8 and prognostic factors, such as Gal-7, in breast cancer. Cell culture experiments were used to find a dependence of the two factors: knockdown of Siglec-8 in cell culture resulted in reduced Gal-7 expression at the mRNA level, suggesting an interaction of these two proteins [2]. Such an interaction has not yet been found in the literature. In GeneCards, an interaction only of Gal-3 with Siglec-8 at the genetic level has been described [107]. The level of expression of Gal-7 in tumor cells is influenced by different mechanisms. For example, the intracellular level of Gal-7 itself regulates the level of Gal-7 mRNA expression [98]. This could be a possible explanation for the fact that a knockdown of Siglec-8 performed in cell culture leads to a decreased mRNA expression of Gal-7. N-acetyllactosamine (LacNAc) epitopes are known to bind to Galectins such as Gal-1, Gal-3 and Gal-7 [108]. For Gal-1, an important role of LacNAcs in the transfer from extracellular to intracellular has been demonstrated: extracellular glycans containing LacNAc epitopes bind Gal-1 and thus trap it extracellularly. An α -2,6-sialylation of these LacNAc epitopes inhibits Gal-1 binding and causes transfer to intracellular and subsequent nucleolar transfer of Gal-1 [99]. A similar mechanism possibly exists for Gal-7. It is possible that Siglec-8 plays a role in this transfer, as it is known to bind sialylated LacNAcs [109]. In this way, Siglec-8 could stabilize sialylated extracellular LacNAc epitopes and promote the release of extracellularly bound Gal-7, which could then be transferred back to intracellular. However, these conjectures need to be followed by further studies to thoroughly analyze and confirm the proposed interactions.

Specific inhibition of Siglec-8 could be a therapeutic strategy in addition to endocrine therapies for certain breast cancer types. Interestingly, an anti-CD33 (= Siglec-3) antibody has been under investigation as part of an antibody-drug conjugate for the treatment of acute myeloid leukemia and has also been approved as an active agent [110]. Several antibody-based therapies are now in clinical trials for the treatment of lymphomas/leukemias and autoimmune diseases [111].

Further studies in cell culture in the context of this thesis, such as stimulation with estradiol had no effect on Siglec-8-mRNA expression. Stimulation with a PPAR γ agonist (Rosiglitazone), on the other hand, resulted in a stable mRNA increase of Siglec-8 [2]. In GeneCards [107], a PPAR γ -binding site is described in the transcription factor of the Siglec-8 gene promoter, which may explain the interaction. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) is a ligand-activated nuclear hormone receptor that functions as a transcription factor and is overexpressed in many tumor types, including breast cancer [112, 113]. The effects of PPAR γ ligands in breast cancer have not been fully elucidated, but data suggest that ligands such as Rosiglitazone inhibit proliferation and induce apoptosis [114]. Rosiglitazone has been investigated in clinical trials [115], but without notable success [116]. The efficacy of PPAR γ therapy could be improved by a better understanding of proteins involved in related signaling pathways, such as Siglec-8. Siglec-F in mice is believed to be the equivalent of Siglec-8 in humans [117]. Therefore, experiments could be performed in vivo mouse models to test the effect.

The role of Siglecs in tumors, including potential therapeutic targets, is currently under investigation. Research is focused on the role of Siglecs as targeted immune checkpoints [67]. The CD33 group of Siglecs has been found to play an important role as immune checkpoint molecules in the tumor microenvironment of breast cancer: Inhibition of Siglec-7 (which is expressed on eosinophils and natural killer (NK) cells) could trigger lysis of tumor cells by NK cells [118]. Siglec-9 is expressed on TAMs and has been shown to interact with MUC1 on tumor cells [119, 120]. In addition, TAMs express high levels of Siglec-10, which interacts with CD24. CD24 may be the dominant innate immune checkpoint in ovarian cancer and TNBC and is a promising target for

cancer immunotherapy [121]. Siglec-1 (=CD169) functions as an adhesion molecule and can facilitate the recognition and internalization of sialic acid-loaded tumor cell parts. Thus, CD169 may be involved in endocytosis of vesicles formed by tumors and allow macrophages to either degrade the contents or enhance uptake, processing, and presentation to increase immune activation [122]. Here, specific targeting of Siglec-1 on the surface of lymph node sinusoidal macrophages to enhance an antitumor immune response is already being explored [123]. CD169-positive macrophages also play an important role in breast cancer and could be used as important markers [124]: They support tumor growth and metastasis and the study of dependent signaling pathways seems essential to therapeutically support the immune response [75, 125]. Siglec-15 is expressed by tumor-associated macrophages and by some tumors, where it is thought to contribute to the immunosuppressive micro-environment, for example via production of TGF- β [126]. Siglec-15, identified on antigen presenting cells as an inhibitor of T-cell activation, is being tested in an early clinical trial in advanced solid tumors using an antibody. Siglec-15 has been coupled to HER2 antibodies and NK cell-mediated tumor cell killing has been tested [127].

All of these studies address the impact of Siglecs on immune cells in the tumor microenvironment. In contrast, this work focused on the role of Siglec-8 on the tumor itself and provides the first evidence for a role of Siglec-8 expression in breast cancer. Further studies need to clarify functional aspects to evaluate its role as a potential therapeutic target.

4.4 Strengths and Limitations

The significance of this work is based on data collection from a large, broad sample collective with a long follow-up period. Nevertheless, the data must be interpreted with caution, as new specific therapy concepts (e.g. HER2 antibodies) have now significantly influenced the survival data and differ markedly from those 20 years ago (time of collection of the collective). *In vivo* studies and further data collection with more cell lines (e.g. HER2-positive breast cancer cells) and with macrophages are necessary to strengthen the significance of this work and to better understand the data in the context of today's therapeutic options.

5. Literaturverzeichnis

- [1] A. Trebo *et al.*, "High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 4, pp. 953-973, Apr 12 2020, doi: 10.3390/cancers12040953.
- [2] A. Trebo *et al.*, "First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 4, pp. 2000-2019, Feb 18 2021, doi: 10.3390/ijms22042000.
- [3] H. Sung *et al.*, "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," (in eng), *CA Cancer J Clin*, pp. 209-249, Feb 4 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [4] A. Ahmad, "Breast Cancer Statistics: Recent Trends," (in eng), *Adv Exp Med Biol*, vol. 1152, pp. 1-7, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_1.
- [5] K.-I. Robert and V. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e, "Krebs in Deutschland 2015/2016," ed: Robert Koch-Institut, 2019.
- [6] G. Cserni, E. Chmielik, B. Cserni, and T. Tot, "The new TNM-based staging of breast cancer," (in eng), *Virchows Arch*, vol. 472, no. 5, pp. 697-703, May 2018, doi: 10.1007/s00428-018-2301-9.
- [7] C. M. Perou *et al.*, "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747-752, 2000/08/01 2000, doi: 10.1038/35021093.
- [8] C. W. Elston and I. O. Ellis, "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up," (in eng), *Histopathology*, vol. 19, no. 5, pp. 403-10, Nov 1991, doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
- [9] J. Makki, "Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance," (in eng), *Clin Med Insights Pathol*, vol. 8, pp. 23-31, 2015, doi: 10.4137/CPath.S31563.
- [10] N. Harbeck *et al.*, "Breast cancer," (in eng), *Nat Rev Dis Primers*, vol. 5, no. 1, p. 66, Sep 23 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- [11] S. S. Coughlin, "Epidemiology of Breast Cancer in Women," (in eng), *Adv Exp Med Biol*, vol. 1152, pp. 9-29, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_2.
- [12] N. Harbeck and M. Gnant, "Breast cancer," *The Lancet*, vol. 389, no. 10074, pp. 1134-1150, 2017/03/18/ 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- [13] A. Wöckel, U. S. Albert, W. Janni, A. Scharl, R. Kreienberg, and T. Stüber, "The Screening, Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Breast Cancer," (in eng), *Dtsch Arztebl Int*, vol. 115, no. 18, pp. 316-323, May 4 2018, doi: 10.3238/arztebl.2018.0316.
- [14] K. Barzaman *et al.*, "Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments," (in eng), *Int Immunopharmacol*, vol. 84, p. 106535, Jul 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535.
- [15] L. A. Emens, "Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes," (in eng), *Clin Cancer Res*, vol. 24, no. 3, pp. 511-520, Feb 1 2018, doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-16-3001.
- [16] A. Cimino-Mathews, J. B. Foote, and L. A. Emens, "Immune targeting in breast cancer," (in eng), *Oncology (Williston Park)*, vol. 29, no. 5, pp. 375-85, May 2015.
- [17] K. D. Maureen E. Taylor, O. U. Press, Ed. *Introduction to Glycobiology*. 2011, p. 304.
- [18] A. Varki and T. Angata, "Siglecs--the major subfamily of I-type lectins," (in eng), *Glycobiology*, vol. 16, no. 1, pp. 1r-27r, Jan 2006, doi: 10.1093/glycob/cwj008.
- [19] S. H. Barondes *et al.*, "Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins," *Cell*, vol. 76, no. 4, pp. 597-598, 1994/02/25/ 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90498-7
- [20] S. H. Barondes, D. N. Cooper, M. A. Gitt, and H. Leffler, "Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 269, no. 33, pp. 20807-10, Aug 19 1994.

- [21] R. D. Cummings and F. T. Liu, "Galectins," in *Essentials of Glycobiology*, nd et al. Eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California., 2009.
- [22] H. Leffler, S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, and F. Poirier, "Introduction to galectins," (in eng), *Glycoconj J*, vol. 19, no. 7-9, pp. 433-40, 2002, doi: 10.1023/b:Glyc.0000014072.34840.04.
- [23] R. Y. Yang, G. A. Rabinovich, and F. T. Liu, "Galectins: structure, function and therapeutic potential," (in eng), *Expert Rev Mol Med*, vol. 10, p. e17, Jun 13 2008, doi: 10.1017/s1462399408000719.
- [24] C. Boscher, J. W. Dennis, and I. R. Nabi, "Glycosylation, galectins and cellular signaling," (in eng), *Curr Opin Cell Biol*, vol. 23, no. 4, pp. 383-92, Aug 2011, doi: 10.1016/j.ceb.2011.05.001.
- [25] G. García Caballero et al., "How galectins have become multifunctional proteins," (in eng), *Histol Histopathol*, vol. 35, no. 6, pp. 509-539, Jun 2020, doi: 10.14670/hh-18-199.
- [26] A. H. Ebrahim et al., "Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy," (in eng), *Ann Transl Med*, vol. 2, no. 9, p. 88, Sep 2014, doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.12.
- [27] M. F. Brinchmann, D. M. Patel, and M. H. Iversen, "The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation," (in eng), *Mediators Inflamm*, vol. 2018, p. 9186940, 2018, doi: 10.1155/2018/9186940.
- [28] M. R. Girotti, M. Salatino, T. Dalotto-Moreno, and G. A. Rabinovich, "Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression," (in eng), *J Exp Med*, vol. 217, no. 2, Feb 3 2020, doi: 10.1084/jem.20182041.
- [29] V. L. Thijssen, R. Heusschen, J. Caers, and A. W. Griffioen, "Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1855, no. 2, pp. 235-47, Apr 2015, doi: 10.1016/j.bbcan.2015.03.003.
- [30] F. T. Liu and G. A. Rabinovich, "Galectins as modulators of tumour progression," (in eng), *Nat Rev Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 29-41, Jan 2005, doi: 10.1038/nrc1527.
- [31] M. A. Folgueira et al., "Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series," (in eng), *Biosci Rep*, vol. 33, no. 6, Dec 12 2013, doi: 10.1042/bsr20130060.
- [32] A. C. Kolbl, U. Andergassen, and U. Jeschke, "The Role of Glycosylation in Breast Cancer Metastasis and Cancer Control," (in eng), *Front Oncol*, vol. 5, p. 219, 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00219.
- [33] T. Dalotto-Moreno et al., "Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease," (in eng), *Cancer Res*, vol. 73, no. 3, pp. 1107-17, Feb 1 2013, doi: 10.1158/0008-5472.Can-12-2418.
- [34] N. S. Goud, P. S. L. Soukya, M. Ghouse, D. Komal, R. Alvala, and M. Alvala, "Human Galectin-1 and Its Inhibitors: Privileged Target for Cancer and HIV," (in eng), *Mini Rev Med Chem*, vol. 19, no. 16, pp. 1369-1378, 2019, doi: 10.2174/1389557519666190304120821.
- [35] N. S. Goud and A. Bhattacharya, "Human Galectin-1 in Multiple Cancers: A Privileged Molecular Target in Oncology," (in eng), *Mini Rev Med Chem*, vol. 21, no. 15, pp. 2169-2186, 2021, doi: 10.2174/1389557521666210217093815.
- [36] G. Simone et al., "Galectin-3 coats the membrane of breast cells and makes a signature of tumours," (in eng), *Mol Biosyst*, vol. 10, no. 2, pp. 258-65, Feb 2014, doi: 10.1039/c3mb70359b.
- [37] H. Zhang et al., "Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e103482, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103482.

- [38] A. Danguy, I. Camby, and R. Kiss, "Galectins and cancer," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1572, no. 2-3, pp. 285-93, Sep 19 2002, doi: 10.1016/s0304-4165(02)00315-x.
- [39] A. Irie *et al.*, "Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer," (in eng), *Clin Cancer Res*, vol. 11, no. 8, pp. 2962-8, Apr 15 2005, doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-04-0861.
- [40] D. K. Hsu, R. Y. Yang, and F. T. Liu, "Galectins in apoptosis," (in eng), *Methods Enzymol*, vol. 417, pp. 256-73, 2006, doi: 10.1016/s0076-6879(06)17018-4.
- [41] T. Advedissian, F. Deshayes, and M. Viguier, "Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 12, Dec 19 2017, doi: 10.3390/ijms18122760.
- [42] Y. St-Pierre, C. G. Campion, and A. A. Grosset, "A distinctive role for galectin-7 in cancer ?," (in eng), *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol. 17, pp. 438-50, Jan 1 2012, doi: 10.2741/3937.
- [43] D. Talantov *et al.*, "Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions," (in eng), *Clin Cancer Res*, vol. 11, no. 20, pp. 7234-42, Oct 15 2005, doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-05-0683.
- [44] K. Biron-Pain, A. A. Grosset, F. Poirier, L. Gaboury, and Y. St-Pierre, "Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas," (in eng), *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e63307, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063307.
- [45] S. J. Kim, J. A. Hwang, J. Y. Ro, Y. S. Lee, and K. H. Chun, "Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer," (in eng), *Oncotarget*, vol. 4, no. 9, pp. 1461-71, Sep 2013, doi: 10.18632/oncotarget.1219.
- [46] S. Langbein *et al.*, "Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance," (in eng), *Histopathology*, vol. 51, no. 5, pp. 681-90, Nov 2007, doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02852.x.
- [47] H. Zhu *et al.*, "Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: Clinicopathological and in vitro evidence," (in eng), *Int J Cancer*, vol. 132, no. 5, pp. 1051-9, Mar 1 2013, doi: 10.1002/ijc.27764.
- [48] J. Chen, Q. Y. He, A. P. Yuen, and J. F. Chiu, "Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis," (in eng), *Proteomics*, vol. 4, no. 8, pp. 2465-75, Aug 2004, doi: 10.1002/pmic.200300762.
- [49] X. Zhu, M. Ding, M. L. Yu, M. X. Feng, L. J. Tan, and F. K. Zhao, "Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 10, p. 290, Jun 15 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-290.
- [50] S. Rorive *et al.*, "Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications," (in eng), *Mod Pathol*, vol. 15, no. 12, pp. 1294-301, Dec 2002, doi: 10.1097/01.Mp.0000037306.19083.28.
- [51] V. Pergialiotis *et al.*, "Galectins-1, -3, -7, -8 and -9 as prognostic markers for survival in epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis," (in eng), *Int J Gynaecol Obstet*, vol. 152, no. 3, pp. 299-307, Mar 2021, doi: 10.1002/ijgo.13471.
- [52] J. Lu, H. Pei, M. Kaeck, and H. J. Thompson, "Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis," (in eng), *Mol Carcinog*, vol. 20, no. 2, pp. 204-15, Oct 1997, doi: 10.1002/(sici)1098-2744(199710)20:2<204::aid-mc7>3.0.co;2-m.
- [53] M. Demers *et al.*, "Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 176, no. 6, pp. 3023-31, Jun 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090876.

- [54] A. A. Grosset, F. Poirier, L. Gaboury, and Y. St-Pierre, "Galectin-7 Expression Potentiates HER-2-Positive Phenotype in Breast Cancer," (in eng), *PLoS One*, vol. 11, no. 11, p. e0166731, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0166731.
- [55] C. G. Champion, M. Labrie, G. Lavoie, and Y. St-Pierre, "Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53," (in eng), *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e72468, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072468.
- [56] F. Ferragut *et al.*, "Dual knockdown of Galectin-8 and its glycosylated ligand, the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166), synergistically delays in vivo breast cancer growth," (in eng), *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, vol. 1866, no. 8, pp. 1338-1352, Aug 2019, doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.03.010.
- [57] Y. Levy, D. Ronen, A. D. Bershadsky, and Y. Zick, "Sustained induction of ERK, protein kinase B, and p70 S6 kinase regulates cell spreading and formation of F-actin microspikes upon ligation of integrins by galectin-8, a mammalian lectin," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 293, no. 19, p. 7265, May 11 2018, doi: 10.1074/jbc.W118.003467.
- [58] H. E. Miwa, W. R. Koba, E. J. Fine, O. Giricz, P. A. Kenny, and P. Stanley, "Bisected, complex N-glycans and galectins in mouse mammary tumor progression and human breast cancer," (in eng), *Glycobiology*, vol. 23, no. 12, pp. 1477-90, Dec 2013, doi: 10.1093/glycob/cwt075.
- [59] S. von Gunten and B. S. Bochner, "Basic and clinical immunology of Siglecs," (in eng), *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1143, pp. 61-82, Nov 2008, doi: 10.1196/annals.1443.011.
- [60] P. R. Crocker *et al.*, "Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins," (in eng), *Glycobiology*, vol. 8, no. 2, p. v, Feb 1998, doi: 10.1093/oxfordjournals.glycob.a018832.
- [61] A. Varki, R. L. Schnaar, and P. R. Crocker, "I-Type Lectins," in *Essentials of Glycobiology*, rd *et al.* Eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved., 2015, pp. 453-467.
- [62] S. Duan and J. C. Paulson, "Siglecs as Immune Cell Checkpoints in Disease," (in eng), *Annu Rev Immunol*, vol. 38, pp. 365-395, Apr 26 2020, doi: 10.1146/annurev-immunol-102419-035900.
- [63] M. S. Macauley, P. R. Crocker, and J. C. Paulson, "Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease," (in eng), *Nat Rev Immunol*, vol. 14, no. 10, pp. 653-66, Oct 2014, doi: 10.1038/nri3737.
- [64] J. A. O'Sullivan, A. T. Chang, B. A. Youngblood, and B. S. Bochner, "Eosinophil and mast cell Siglecs: From biology to drug target," (in eng), *J Leukoc Biol*, Jan 22 2020, doi: 10.1002/jlb.2mr0120-352rr.
- [65] R. D. Pesek and S. K. Gupta, "Future therapies for eosinophilic gastrointestinal disorders," (in eng), *Ann Allergy Asthma Immunol*, Nov 26 2019, doi: 10.1016/j.anai.2019.11.018.
- [66] M. K. O'Reilly and J. C. Paulson, "Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease," (in eng), *Trends Pharmacol Sci*, vol. 30, no. 5, pp. 240-8, May 2009, doi: 10.1016/j.tips.2009.02.005.
- [67] O. J. Adams, M. A. Stanczak, S. von Gunten, and H. Läubli, "Targeting sialic acid-Siglec interactions to reverse immune suppression in cancer," (in eng), *Glycobiology*, vol. 28, no. 9, pp. 640-647, Sep 1 2018, doi: 10.1093/glycob/cwx108.
- [68] C. H. Lin, Y. C. Yeh, and K. D. Yang, "Functions and therapeutic targets of Siglec-mediated infections, inflammations and cancers," (in eng), *J Formos Med Assoc*, vol. 120, no. 1 Pt 1, pp. 5-24, Jan 2021, doi: 10.1016/j.jfma.2019.10.019.
- [69] G. Murugesan, B. Weigle, and P. R. Crocker, "Siglec and anti-Siglec therapies," (in eng), *Curr Opin Chem Biol*, vol. 62, pp. 34-42, Jun 2021, doi: 10.1016/j.cbpa.2021.01.001.
- [70] B. Li, H. L. Chan, and P. Chen, "Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges," (in eng), *Curr Med Chem*, vol. 26, no. 17, pp. 3009-3025, 2019, doi: 10.2174/0929867324666170804143706.

- [71] J. A. Marin-Acevedo, E. O. Kimbrough, and Y. Lou, "Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond," (in eng), *J Hematol Oncol*, vol. 14, no. 1, p. 45, Mar 19 2021, doi: 10.1186/s13045-021-01056-8.
- [72] J. B. Haanen and C. Robert, "Immune Checkpoint Inhibitors," (in eng), *Prog Tumor Res*, vol. 42, pp. 55-66, 2015, doi: 10.1159/000437178.
- [73] Q. Haas, C. Simillion, and S. von Gunten, "A Cartography of Siglecs and Sialyltransferases in Gynecologic Malignancies: Is There a Road Towards a Sweet Future?," (in eng), *Front Oncol*, vol. 8, p. 68, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00068.
- [74] L. Cassetta *et al.*, "Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets," (in eng), *Cancer Cell*, vol. 35, no. 4, pp. 588-602.e10, Apr 15 2019, doi: 10.1016/j.ccell.2019.02.009.
- [75] W. Jing *et al.*, "Breast cancer cells promote CD169(+) macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages," (in eng), *Int Immunopharmacol*, vol. 78, p. 106012, Jan 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2019.106012.
- [76] B. S. Bochner, "Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors," (in eng), *Clin Exp Allergy*, vol. 39, no. 3, pp. 317-324, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03173.x.
- [77] H. Floyd *et al.*, "Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 2, pp. 861-6, Jan 14 2000, doi: 10.1074/jbc.275.2.861.
- [78] Y. Jia *et al.*, "Expression of ligands for Siglec-8 and Siglec-9 in human airways and airway cells," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 135, no. 3, pp. 799-810.e7, Mar 2015, doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.004.
- [79] H. Yu *et al.*, "Siglec-8 and Siglec-9 binding specificities and endogenous airway ligand distributions and properties," (in eng), *Glycobiology*, vol. 27, no. 7, pp. 657-668, Jul 1 2017, doi: 10.1093/glycob/cwx026.
- [80] S. Arakawa *et al.*, "Expression of Siglec-8 is regulated by interleukin-5, and serum levels of soluble Siglec-8 may predict responsiveness of severe eosinophilic asthma to mepolizumab," (in eng), *Allergol Int*, vol. 67s, pp. S41-s44, Sep 2018, doi: 10.1016/j.alit.2018.03.006.
- [81] H. J. Na, S. A. Hudson, and B. S. Bochner, "IL-33 enhances Siglec-8 mediated apoptosis of human eosinophils," (in eng), *Cytokine*, vol. 57, no. 1, pp. 169-74, Jan 2012, doi: 10.1016/j.cyto.2011.10.007.
- [82] E. Nutku-Bilir, S. A. Hudson, and B. S. Bochner, "Interleukin-5 priming of human eosinophils alters siglec-8 mediated apoptosis pathways," (in eng), *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 38, no. 1, pp. 121-4, Jan 2008, doi: 10.1165/rcmb.2007-0154OC.
- [83] T. Kiwamoto, N. Kawasaki, J. C. Paulson, and B. S. Bochner, "Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions," (in eng), *Pharmacol Ther*, vol. 135, no. 3, pp. 327-36, Sep 2012, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.06.005.
- [84] E. S. Dellon *et al.*, "Anti-Siglec-8 Antibody for Eosinophilic Gastritis and Duodenitis," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 383, no. 17, pp. 1624-1634, Oct 22 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2012047.
- [85] B. A. Youngblood *et al.*, "Discovery, Function, and Therapeutic Targeting of Siglec-8," (in eng), *Cells*, vol. 10, no. 1, Dec 24 2020, doi: 10.3390/cells10010019.
- [86] S. A. Hudson *et al.*, "Developmental, malignancy-related, and cross-species analysis of eosinophil, mast cell, and basophil siglec-8 expression," (in eng), *J Clin Immunol*, vol. 31, no. 6, pp. 1045-53, Dec 2011, doi: 10.1007/s10875-011-9589-4.
- [87] A. Chairmadurai, S. K. Jain, A. Jain, and H. Prakash, "Rapid Arc-SBRT: Non-invasive immune adjuvant for advanced stage Non-Small Cell Lung Carcinoma," (in eng), *Anticancer Agents Med Chem*, Mar 21 2021, doi: 10.2174/1871520621666210322105641.

- [88] C. Ou *et al.*, "Enhancement of Siglec-8 expression predicts adverse prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma," (in eng), *Urol Oncol*, vol. 35, no. 10, pp. 607.e1-607.e8, Oct 2017, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.05.016.
- [89] Y. Cao *et al.*, "Decreased expression of Siglec-8 associates with poor prognosis in patients with gastric cancer after surgical resection," (in eng), *Tumour Biol*, vol. 37, no. 8, pp. 10883-91, Aug 2016, doi: 10.1007/s13277-016-4859-7.
- [90] W. Remmele and H. E. Stegner, "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]," (in ger), *Pathologe*, vol. 8, no. 3, pp. 138-40, May 1987. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe.
- [91] A. A. Grosset, M. Labrie, M. C. Vladiou, E. M. Yousef, L. Gaboury, and Y. St-Pierre, "Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets," *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18183-203, Apr 5 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7784.
- [92] H. Y. Kuo, H. T. Hsu, Y. C. Chen, Y. W. Chang, F. T. Liu, and C. W. Wu, "Galectin-3 modulates the EGFR signalling-mediated regulation of Sox2 expression via c-Myc in lung cancer," (in eng), *Glycobiology*, vol. 26, no. 2, pp. 155-65, Feb 2016, doi: 10.1093/glycob/cwv088.
- [93] T. Piyush, 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," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 24, no. 11, pp. 1937-1947, Nov 2017, doi: 10.1038/cdd.2017.119.
- [94] K. L. Wu *et al.*, "Extracellular galectin-3 facilitates colon cancer cell migration and is related to the epidermal growth factor receptor," (in eng), *Am J Transl Res*, vol. 10, no. 8, pp. 2402-2412, 2018.
- [95] M. C. Carlsson *et al.*, "Different fractions of human serum glycoproteins bind galectin-1 or galectin-8, and their ratio may provide a refined biomarker for pathophysiological conditions in cancer and inflammatory disease," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1820, no. 9, pp. 1366-72, Sep 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.01.007.
- [96] D. Compagno *et al.*, "Galectins as Checkpoints of the Immune System in Cancers, Their Clinical Relevance, and Implication in Clinical Trials," (in eng), *Biomolecules*, vol. 10, no. 5, May 12 2020, doi: 10.3390/biom10050750.
- [97] M. T. Elola, F. Ferragut, S. P. Méndez-Huergo, D. O. Croci, C. Bracalente, and G. A. Rabinovich, "Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment," (in eng), *Cell Immunol*, vol. 333, pp. 34-45, Nov 2018, doi: 10.1016/j.cellimm.2018.03.008.
- [98] N. Bibens-Laulan and Y. St-Pierre, "Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7," (in eng), *PLoS One*, vol. 12, no. 11, p. e0187194, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0187194.
- [99] R. Bhat *et al.*, "Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 33, pp. E4820-7, Aug 16 2016, doi: 10.1073/pnas.1609135113.
- [100] X. Zhao *et al.*, "Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature," (in eng), *Oncotarget*, vol. 8, no. 18, pp. 30576-30586, May 2 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15736.
- [101] C. G. Champion, M. Labrie, A. A. Grosset, and Y. St-Pierre, "The CCAAT/enhancer-binding protein beta-2 isoform (CEBPbeta-2) upregulates galectin-7 expression in human breast cancer cells," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e95087, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0095087.

- [102] A. A. Grosset *et al.*, "Cytosolic galectin-7 impairs p53 functions and induces chemoresistance in breast cancer cells," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 14, p. 801, Nov 3 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-801.
- [103] L. Vuong *et al.*, "An Orally Active Galectin-3 Antagonist Inhibits Lung Adenocarcinoma Growth and Augments Response to PD-L1 Blockade," (in eng), *Cancer Res*, vol. 79, no. 7, pp. 1480-1492, Apr 1 2019, doi: 10.1158/0008-5472.Can-18-2244.
- [104] T. C. Shih, R. Liu, G. Fung, G. Bhardwaj, P. M. Ghosh, and K. S. Lam, "A Novel Galectin-1 Inhibitor Discovered through One-Bead Two-Compound Library Potentiates the Antitumor Effects of Paclitaxel in vivo," (in eng), *Mol Cancer Ther*, vol. 16, no. 7, pp. 1212-1223, Jul 2017, doi: 10.1158/1535-7163.Mct-16-0690.
- [105] M. T. Elola *et al.*, "Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors," (in eng), *Histol Histopathol*, vol. 29, no. 9, pp. 1093-105, Sep 2014, doi: 10.14670/hh-29.1093.
- [106] P. Bieniasz-Krzywiec and M. Mazzone, "PoEMs edit breast cancer outcome," (in eng), *Aging (Albany NY)*, vol. 12, no. 5, pp. 4045-4047, Feb 26 2020, doi: 10.18632/aging.102870.
- [107] G. Stelzer *et al.*, "The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses," *Current Protocols in Bioinformatics*, vol. 54, no. 1, pp. 1.30.1-1.30.33, 2016, doi: 10.1002/cpbi.5.
- [108] S. Morris *et al.*, "Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7," (in eng), *Glycobiology*, vol. 14, no. 3, pp. 293-300, Mar 2004, doi: 10.1093/glycob/cwh029.
- [109] E. M. Rapoport, G. V. Pazynina, M. A. Sablina, P. R. Crocker, and N. V. Bovin, "Probing sialic acid binding Ig-like lectins (siglecs) with sulfated oligosaccharides," (in eng), *Biochemistry (Mosc)*, vol. 71, no. 5, pp. 496-504, May 2006, doi: 10.1134/s0006297906050051.
- [110] J. G. Jurcic, "Ab therapy of AML: native anti-CD33 Ab and drug conjugates," (in eng), *Cytotherapy*, vol. 10, no. 1, pp. 7-12, 2008, doi: 10.1080/14653240701519012.
- [111] T. Angata, C. M. Nycholat, and M. S. Macauley, "Therapeutic Targeting of Siglecs using Antibody- and Glycan-Based Approaches," (in eng), *Trends Pharmacol Sci*, vol. 36, no. 10, pp. 645-660, Oct 2015, doi: 10.1016/j.tips.2015.06.008.
- [112] M. H. Fenner and E. Elstner, "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands for the treatment of breast cancer," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 14, no. 6, pp. 557-568, 2005/06/01 2005, doi: 10.1517/13543784.14.6.557.
- [113] I. Kotta-Loizou, C. Giaginis, and S. Theocharis, "The role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in breast cancer," (in eng), *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 12, no. 9, pp. 1025-44, Nov 2012, doi: 10.2174/187152012803529664.
- [114] P. Fan, B. Abderrahman, T. S. Chai, S. Yerrum, and V. C. Jordan, "Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ to Increase Estrogen-Induced Apoptosis in Estrogen-Deprived Breast Cancer Cells," (in eng), *Mol Cancer Ther*, vol. 17, no. 12, pp. 2732-2745, Dec 2018, doi: 10.1158/1535-7163.Mct-18-0088.
- [115] H. J. Burstein, G. D. Demetri, E. Mueller, P. Sarraf, B. M. Spiegelman, and E. P. Winer, "Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study," (in eng), *Breast Cancer Res Treat*, vol. 79, no. 3, pp. 391-7, Jun 2003, doi: 10.1023/a:1024038127156.
- [116] Y. Z. Chen *et al.*, "PPAR signaling pathway may be an important predictor of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy," (in eng), *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 70, no. 5, pp. 637-44, Nov 2012, doi: 10.1007/s00280-012-1949-0.
- [117] Y. H. Feng and H. Mao, "Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages," (in eng), *J Zhejiang Univ Sci B*, vol. 13, no. 5, pp. 386-94, May 2012, doi: 10.1631/jzus.B1100218.
- [118] H. Prescher *et al.*, "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Small, High-Affinity Siglec-7 Ligands: Toward Novel Inhibitors of Cancer Immune Evasion," (in eng), *J Med Chem*, vol. 60, no. 3, pp. 941-956, Feb 9 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01111.

- [119] V. Barriga, N. Kuol, K. Nurgali, and V. Apostolopoulos, "The Complex Interaction between the Tumor Micro-Environment and Immune Checkpoints in Breast Cancer," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 8, Aug 19 2019, doi: 10.3390/cancers11081205.
- [120] R. Beatson *et al.*, "The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 17, no. 11, pp. 1273-1281, Nov 2016, doi: 10.1038/ni.3552.
- [121] A. A. Barkal *et al.*, "CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy," (in eng), *Nature*, vol. 572, no. 7769, pp. 392-396, Aug 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1456-0.
- [122] I. Fraschilla and S. Pillai, "Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology," (in eng), *Immunol Rev*, vol. 276, no. 1, pp. 178-191, Mar 2017, doi: 10.1111/imr.12526.
- [123] J. Hu *et al.*, "Targeting Lymph Node Sinus Macrophages to Inhibit Lymph Node Metastasis," (in eng), *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 16, pp. 650-662, Jun 7 2019, doi: 10.1016/j.omtn.2019.04.016.
- [124] T. Shiota *et al.*, "The Clinical Significance of CD169-Positive Lymph Node Macrophage in Patients with Breast Cancer," (in eng), *PLoS One*, vol. 11, no. 11, p. e0166680, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0166680.
- [125] F. Björk Gunnarsdottir, N. Auoja, P. O. Bendahl, L. Rydén, M. Fernö, and K. Leandersson, "Co-localization of CD169(+) macrophages and cancer cells in lymph node metastases of breast cancer patients is linked to improved prognosis and PDL1 expression," (in eng), *Oncoimmunology*, vol. 9, no. 1, p. 1848067, Nov 22 2020, doi: 10.1080/2162402x.2020.1848067.
- [126] G. Murugesan *et al.*, "Siglec-15 recognition of sialoglycans on tumor cell lines can occur independently of sialyl Tn antigen expression," (in eng), *Glycobiology*, vol. 31, no. 1, pp. 44-54, Jan 9 2021, doi: 10.1093/glycob/cwaa048.
- [127] N. Rodrigues Mantuano, M. Natoli, A. Zippelius, and H. Läubli, "Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy," (in eng), *J Immunother Cancer*, vol. 8, no. 2, Oct 2020, doi: 10.1136/jitc-2020-001222.

Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke für die herzliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas. Außerdem bedanke ich mich für sein stets offenes Ohr, seinen Optimismus, der mich nicht aufgeben ließ und seine Unterstützung bei der Fertigstellung der Publikationen und meiner Doktorarbeit.

PD Dr. med. Anna Hester danke ich für die intensive Betreuung, die Anregungen und Ratschläge zu den Experimenten und den Publikationen. Ihre Motivation, die Begeisterung für die Forschung und der unermüdliche Einsatz als Ärztin und Wissenschaftlerin sind für mich Inspiration und Vorbild.

Prof. Dr. med Nina Ditsch und Prof. Dr. med. Käab möchte ich danken für die Unterstützung und Betreuung und die wichtigen Anregungen.

Dem Team aus dem Labor der Frauenklinik der LMU Maistraße München möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Insbesondere bei Frau Christina Kuhn möchte ich mich für die freundliche und geduldige Einweisung ins Labor und die vielen gemeinsamen Gespräche bedanken.

Ich danke den ganzen Studierenden im „Team Jeschke“, mit denen ich zahlreiche Stunden im Labor verbracht habe und wo gegenseitiges motivieren und beraten selbstverständlich waren. Insbesondere danke ich Lauritz Vogelsang und Nicole Topalov, die mich so herzlich in die Gruppe aufgenommen haben und mit denen ich musikalisch untermalte Wochenenden im Labor verbringen durfte.

Allen weiteren Coautor*innen der Veröffentlichungen danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Hilfestellungen und wichtigen Anregungen zu meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die allzeitige Unterstützung, für die Ermöglichung des Medizinstudiums, Förderung und Beistand in jeder Lebenslage. Ganz besonders danke ich meiner Schwester Marie, die immer ein offenes Ohr für mich und meine Sorgen hat und die immer an mich glaubt. Der größte Dank gilt Lorenz für die stetige Unterstützung, auf die ich auch in Zukunft bauen kann.

