

Aus dem Zell- und molekularbiologischen Labor der Augenklinik  
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger

***Die inhibitorische Wirkung exogener Galektine-1 und -3  
auf humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen***

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

vorgelegt von

Anna Hillenmayer

---

aus

Starnberg

---

Jahr

2022

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kirsten H. Eibl-Lindner

Mitberichterstatter: PD Dr. Joachim Havla  
Prof. Dr. Ricarda Schumann  
Prof. Dr. Antje Grosche

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Andreas Ohlmann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>VORWORT</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1 DER HINTERE AUGENABSCHNITT	5
1.2 RETINALE GEFÄßVERSORGUNG	7
1.3 NEOVASKULOGENESE	8
1.3.1 RETINALE NEOVASKULOGENESE	9
1.4 MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER ANGIOGENESE	10
1.5 RETINALE VASKULÄRE ERKRANKUNGEN	12
1.6 THERAPIEOPTIONEN DER OKULÄREN NEOVASKULOGENESE	14
1.6.1 LASERKOAGULATION	14
1.6.2 ANTI-VEGF-THERAPIE	14
1.7 HR-GAL1 UND 3	15
1.7.1 FUNKTION DER GALEKTINE	15
1.7.2 EINFLUSS DER GALEKTINE AUF OKULÄRE GEFÄßPROLIFERATIONEN	17
1.8 ZIEL DER ARBEIT	18
<b>2 METHODEN</b>	<b>19</b>
2.1 ZELLKULTUR	19
2.2 HR-GAL1 UND 3	20
2.3 VERSUCHSGRUPPEN	21
2.4 IMMUNFLUORESZENZ	22
2.5 ZELLPROLIFERATION	23
2.5.1 BRDU	23
2.5.2 WST-1	23
2.6 ZELLMIGRATION	24
2.6.1 WUNDINDUZIERT-MIGRATIONSANALYSE	24
2.6.2 TIME-LAPSE MIKROSKOPIE	25
2.7 ADHÄSION	25
2.8 BILDUNG VON KAPILLARÄHNLICHEN STRUKTUREN	26
2.9 ZELLTOXIZITÄT DER HR-GAL	26
2.9.1 NACHWEIS VON HISTON-DNA-KOMPLEXEN	26
2.9.2 DETEKTION AVITALER ZELLEN	27
	2

<b>2.10</b>	<b>PROTEINPRÄPARATION UND WESTERN BLOT ANALYSE</b>	<b>27</b>
<b>2.11</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>LOKALISATION VON GALEKTINEN IN DEN ENDOTHELZELLEN</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>EINFLUSS DER HR-GAL AUF DIE EIGENSCHAFTEN RETINALER ENDOTHELZELLEN</b>	<b>34</b>
3.2.1	INHIBITION DER ZELLPROLIFERATION	34
3.2.2	HEMMUNG DER MIGRATION DURCH HR-GAL1 UND 3	35
3.2.3	HEMMUNG DER ZELLADHÄSION	38
3.2.4	INHIBITION DER BILDUNG VON KAPILLARÄHNLICHEN STRUKTUREN	39
3.2.5	ZELLTOXIZITÄT VON HR-GAL1 UND 3 AUF HRMEC	40
3.2.6	AKTIVIERUNG DES WNT/ $\beta$ -CATENIN SIGNALWEGS DURCH HR-GAL1 UND 3	43
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>INHIBITION DER ANGIOGENESEMECHANISMEN DURCH HR-GAL1 UND 3 <i>IN-VITRO</i></b>	<b>45</b>
4.1.1	DISKUSSION DER VERWENDETEN UNTERSUCHUNGSMETHODEN	45
4.1.2	WIRKUNG VON ENDOGENEN UND REKOMBINANTEN GALEKTINEN	51
<b>4.2</b>	<b>STIMULATION ANGIOGENER SIGNALWEGE</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>WIRKUNGSABHÄNGIGKEIT VON DER GALEKTINLOKALISATION</b>	<b>54</b>
	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
	<b>LITERATUR</b>	<b>59</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>74</b>
	<b>AFFIDAVIT</b>	<b>76</b>

## Vorwort

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in

### **Galectin-1 and -3 in high amounts inhibit angiogenic properties of human retinal microvascular endothelial cells in vitro**

Anna Hillenmayer, Christian M Wertheimer, Arie Geerlof, Siegfried Priglinger, Claudia Priglinger, Kirsten Eibl-Lindner, Andreas Ohlmann

PLoS One, 2022 Mar 23;17(3):e0265805

# 1 Einleitung

## 1.1 Der hintere Augenabschnitt

Der hintere Augenabschnitt ist anatomisch aus drei Schichten aufgebaut, der Lederhaut (Sklera), Aderhaut (Uvea) und Netzhaut (Retina), die sich um den zentral liegenden Glaskörper (Vitreus) legen. (Aumüller et al., 2014) Die Uvea setzt sich zusammen aus dem ventral liegenden Ziliarkörper und der Iris, sowie im hinteren Abschnitt aus der äußeren Gefäßschicht (Choroidea) mit der innenliegenden Bruchmembran. (Krieglstein et al., 1999)

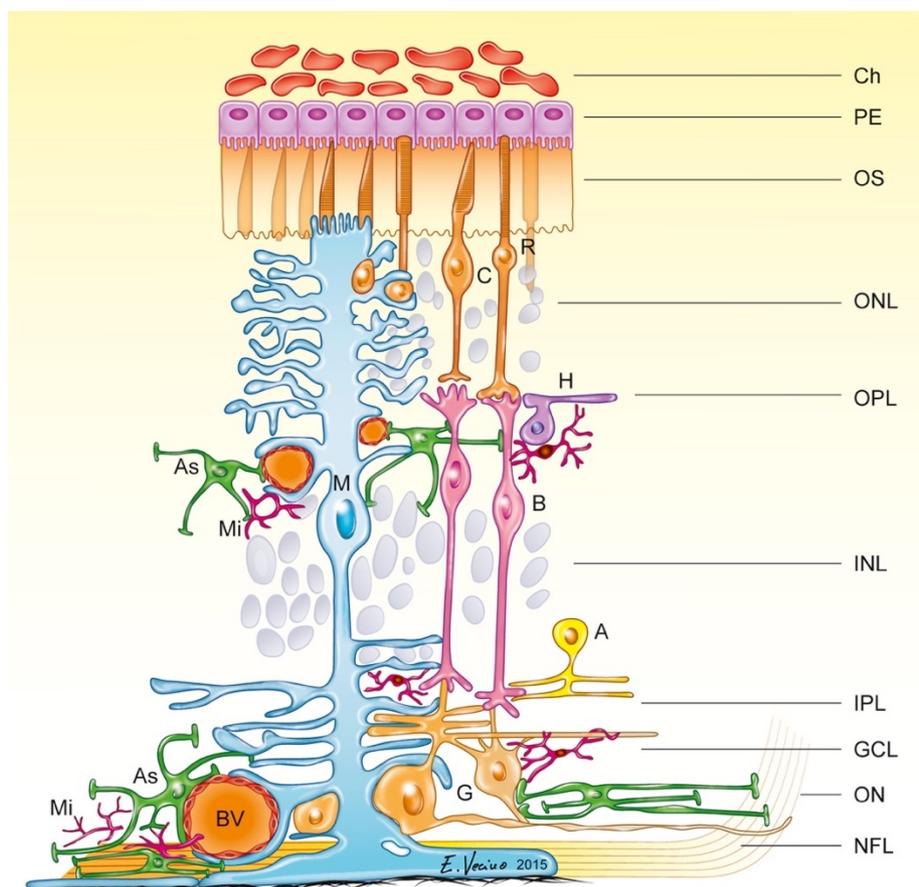
Der lichtempfindliche Abschnitt der Retina, die Pars optica, ist für die Umwandlung von Lichtreizen in elektrische Signale und für deren erste Weiterverarbeitung und Weiterleitung an die Verarbeitungszentren im Gehirn zuständig. (Remington, 2012)

Von außen nach innen finden sich über der Bruchmembran die neun Schichten der Retina, beginnend mit den retinalen Pigmentepithelzellen (rPE-Zellen). (Gupta et al., 2016) Das rPE dient dem gerichteten Stoffaustausch zwischen Choroidea und Retina, sowie dem Abbau von verbrauchten Außensegmenten und der Absorption „überschüssigen“ Lichts. (Kellner and Wachtlin, 2008) Die Tight Junctions des rPEs (Zonulae occludentes) bilden die äußere Blut-Retina-Schranke, schützen die Neuroretina durch selektive Permeabilität vor Blutbestandteilen und stellen das Immunprivileg des Auges sicher. (Strauss, 2005)

Es folgen die äußeren Netzhautschichten mit den Photorezeptoren, den Stäbchen und Zapfen. Die Photorezeptoren sind für die Umwandlung von Lichtreizen in elektrische Signale zuständig. (Carlson, 2019) Sie werden anatomisch in weitere Schichten unterteilt, in die Außensegmentenschicht der Stäbchen und Zapfen und in die äußere Körnerschicht mit ihren Innensegmenten. (Grehn, 2009) Zwischen den beiden Schichten liegt noch die äußere Gliagrenzmembran, die aus den Füßchen der Müllergliazellen gebildet wird. (Grehn, 2009) Nach innen folgt nun die äußere, plexiforme Schicht mit den Synapsen zwischen den Photorezeptoren, den Bipolar- und den Horizontalzellen. (Remington, 2012) Die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal-, Müller- und amakrinen Zellen liegen in der inneren Körnerschicht. (Masland, 2012a) Die innere plexiforme Schicht enthält die nächste Synapsenverbindung zu den

Ganglienzellen. (Masland, 2012a) Zusammen mit der äußeren plexiformen Schicht und den Ganglienzellsomata führen sie die erste Verrechnung der Sehinformation durch. (Hubel and Wiesel, 1962) Ganglienzellen bilden eine eigene Ganglienzellfaserschicht, ihre marklosen Axone laufen am blinden Fleck, der Papilla nervi optici zusammen. (2008) Die Netzhaut wird zum Glaskörper hin von der inneren Gliagrenzmembran, bestehend aus der Basallamina der Müller- und der amakrinen Zellen, abgedeckt. (Masland, 2012b) Astrozyten stellen neben den Müllerzellen die in der Retina ansässigen Makroglia. (Ramírez et al., 1998) Die Astrozyten sind entlang retinaler Gefäßstrukturen in dem oberen Plexus ansässig. Die Müllerzellkörper hingegen sind in der inneren Körnerschicht zu finden und ihre Ausläufer durchspannen die gesamten retinalen Schichten. (Vecino et al., 2016) (Abbildung 1) Hierdurch tragen sie wesentlich zur Stabilität der Blut-Retina Schranke des intermediären und tiefen Plexus bei bei fehlender Präsenz der Astrozyten in diesen Schichten. (Reichenbach and Bringmann, 2020)

Die Makula ist ein Teil der Netzhaut und der Bereich mit der höchsten Dichte an Stäbchen. Sie ist der Punkt des schärfsten Sehens und liegt auf der zentralen Netzhaut temporal der Papilla nervi optici. (Gregg et al., 2013)



*Abbildung 1:* Anatomie der Netzhaut. Das Pigmentepithel (PE) liegt der Choriokapillaris (Ch) auf. Es folgen die neun Schichten der Retina: die Außensegmentenschicht (OS), die äußere Körnerschicht (ONL), die äußere plexiforme Schicht (OPL), die innere Körnerschicht (INL), die innere plexiforme Schicht (IPL), die Ganglienzellschicht (GCL) und die Axonschicht (NFL), die zur Papille hin den Nervus Opticus bildet (ON). Astrozyten (As) finden sich entlang der Blutgefäße (BV), Müllerzellen durchspannen alle Schichten (M). (übernommen aus (Vecino et al., 2016))

## 1.2 Retinale Gefäßversorgung

Die Gefäßversorgung der Retina erfolgt über Äste der Arteria ophtalmica, die aus der Arteria carotica interna abzweigt. (Grehn, 2009) Zahlreiche Äste der Arteria carotica externa sichern über Kollateralen ebenso die Versorgung. (Kur et al., 2012) Aus der Arteria ophtalmica gehen mehrere Arteriae ciliaris ab, die in die Choroidea ziehen. (Forrester et al., 2016) In der Choroidea verdünnen sich diese Arterien zur Lamina choriocapillaris mit stark fenestriertem Endothel direkt unterhalb des rPE. (Anand-Apte and Hollyfield, 2010) Das rPE gibt anschließend die Nährstoffe aus der Choriokapillaris über transzelluläre Mechanismen an die äußeren Netzhautschichten weiter. (Thumann et al., 2013)

Die inneren Netzhautschichten werden von der Arteria centralis retinae, einem weiteren Ast der Arteria ophtalmica, versorgt. Die retinale vaskuläre Versorgung lässt sich insgesamt in vier größere Äste unterteilen. (Lavia et al., 2020) Die Zentralarterie zieht durch die Papilla nervi optici und verläuft auf der Netzhautoberfläche als superfizielles Netzwerk mit eher größerlumigen Arterien, Arteriolen und Kapillaren. Sie bildet innerhalb der Ganglienzellschicht ihre Endäste. (Purnyn, 2013) Als weiterer Plexus wird das radiäre peripapilläre Netzwerk gesehen, dessen Gefäße parallel zu den Axonen der Nervenfaserschicht verlaufen. (Henkind, 1967) Zwei kapilläre Plexus finden sich tiefer in den retinalen Schichten über, sowie unter der inneren Körnerschicht als „intermediärer“ und „tiefer“ Plexus, versorgt über Anastomosen des oberflächlichen Netzwerkes. (Campbell et al., 2017)

Die Tight Junctions des Kapillarendothels bilden zusammen mit den simultan verlaufenden und stabilisierenden Astrozyten (West et al., 2005, Scott et al., 2010) die innere Blut-Retina-Schranke und sind - anders als die Choriokapillaris - nicht fenestriert. (Runkle and Antonetti, 2011) (*Abbildung 2*)

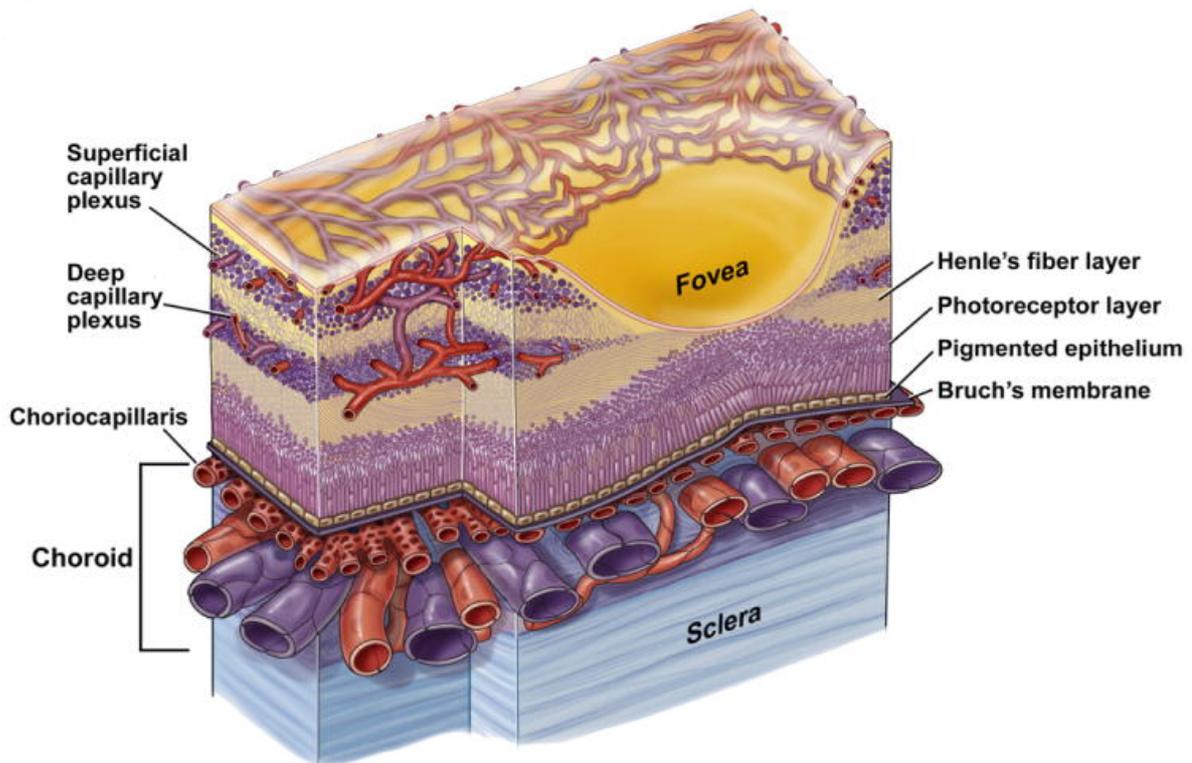


Abbildung 2: retinale und choroidale Gefäßversorgung. Die Choriokapillaris versorgt per Diffusion über das rPE die äußeren Netzhautschichten. Die inneren Schichten sind für die Nährstoffversorgung auf das retinale Gefäßbett mit dem oberflächlichen und tieferen Plexus angewiesen. (übernommen aus (Kur et al., 2012))

### 1.3 Neovaskulogenese

Als Antwort auf diverse Wachstumsfaktoren proliferieren bei der physiologischen retinalen Angiogenese vaskuläre Zellen geordnet zu neuen Gefäßen. (Selvam et al., 2018) Pathologische okuläre Neovaskulogenese ist hingegen ungeordnet und führt zu Dysfunktion in den Gefäßstrukturen. (Henkind and Wise, 1974) Dies mündet unter anderem in Ödemen, fibrösen Proliferationen, Blutungen und Netzhautablösungen. (Dorrell et al., 2007)

In Übersichtsarbeiten über die häufigsten Ursachen für Blindheit in der europäischen Union werden neovaskuläre Erkrankungen wie die altersbedingte Makuladegeneration, die diabetische Retinopathie, retinale Venenverschlüsse bei Erwachsenen (Prokofyeva and Zrenner, 2012, Jo et al., 2010, Laouri et al.,

2011) sowie die Retinopathia praematorum bei Kindern als Hauptursachen für Erblindung genannt. (Mutlu and Sarici, 2013)

Unterscheiden lassen sich zwei, die Netzhaut versorgende Gefäßsysteme: das choroidale und das retinale. (Bowling et al., 2017)

### 1.3.1 Retinale Neovaskulogenese

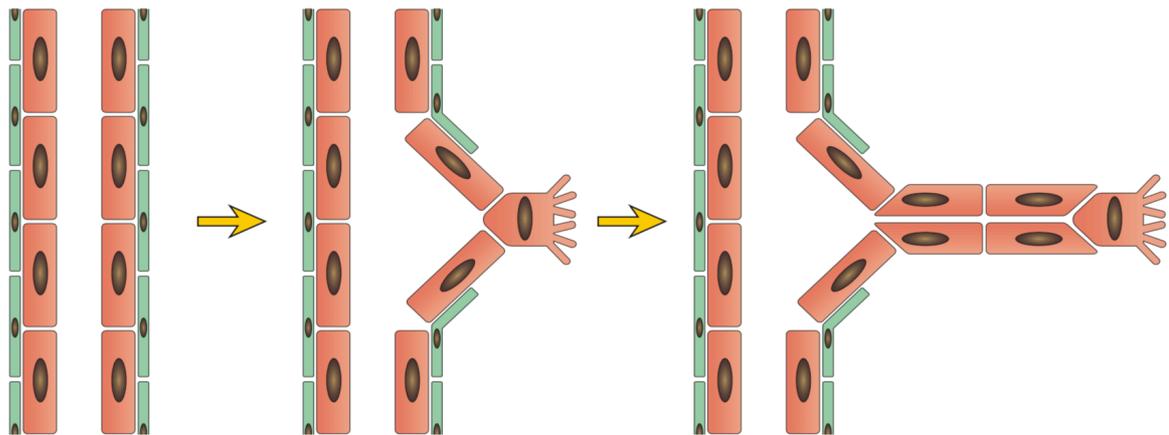
Die retinale Angiogenese ist eine Form des sprossenden Gefäßwachstums, d.h. an bereits vorhandenen Gefäßen bilden sich neue vaskuläre Strukturen. (Adair and Montani, 2011) Retinale Neovaskulogenese beginnt an den retinalen Gefäßen und kann im Verlauf Glaskörper und neuronale Netzhautschichten infiltrieren. (Crawford et al., 2009, Campochiaro, 2013, Henkind and Wise, 1974) Das Wachstum der Gefäße ist unkontrolliert und sorgt für eine weitere Zerstörung retinaler Strukturen und daraus resultierend einen Visusverlust. (Crawford et al., 2009) Es bilden sich fibrovaskuläre Areale aus, die zu Traktionen an der Netzhaut und dem Glaskörper führen, aufgrund fenestrierter Endothelzellen Ödeme bilden und durch Instabilität zu Blutungen neigen. (Campochiaro, 2013, Klaassen et al., 2013)

Die Bildung neuer Gefäße und die Degeneration des vorhandenen Netzwerkes, z.B. bei Diabetes mellitus, ist die Reaktion auf veränderte funktionelle und metabolische Bedürfnisse des umgebenden Gewebes. (Pournaras et al., 2008) Durch ausgeschüttete inflammatorische Stimuli werden die Gefäße der Retina undicht und es erfolgt eine Veränderung der Tight Junctions. (Selvam et al., 2018, Klaassen et al., 2013, Kaur et al., 2008)

Die retinale Ischämie bedingt eine vermehrte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, diese regen die Endothelzellen an zu proliferieren und die Endothelvorläuferzellen migrieren zum Ort der Aussprossung. (Adair et al., 1990) Die Endothelzellen adhärieren dort und der entstehende Gefäßspross wächst unter weiterer Proliferation der Stalking-Endothelzellen und der Leitung einer Endothel-Tipzelle durch die zuvor lysierte extrazelluläre Matrix (EZM) in Richtung des angiogenen Signals. (Linder, 2007) Es bilden sich Vakuolen, die unter Zusammenlagerung einer genügend großen Zellzahl zu einem Lumen verschmelzen. (Risau, 1997, Adair and Montani, 2011)

(Abbildung 3)

Die Reifung und Stabilisation des neu gebildeten Gefäßspross erfolgt in der physiologisch gesteuerten Angiogenese durch Anlagerung der Perizyten und durch Bildung neuer EZM. (Ozerdem and Stallcup, 2003, Darland et al., 2003) Bei der Gefäßproliferation durch pathologische Aktivierung fehlt die Ausbildung neuer Tight Junctions und es kommt zum Verlust der Perizyten und ihrer stabilisierenden Eigenschaften. (Hall, 2006) Die neuen Gefäße sind instabil und undicht, Plasmaaustritt mit Ödembildung und Blutungen sind die Folge. (Hammes, 2005)



*Abbildung 3* : Angiogenese. Proliferation, Migration, Zelladhäsion und Gefäßformierung bei der Angiogenese. (modifiziert nach (Carmeliet and Jain, 2011))

#### 1.4 Molekulare Grundlagen der Angiogenese

Nach bisherigem Wissensstand schreibt man der Ischämie und der darauffolgenden Entzündung und Hypoxie wichtige Rollen innerhalb der pathologischen Angiogenese zu. (Alizadeh et al., 2018) Die Retina ist eines der metabolisch aktivsten Gewebe des Körpers. (Alizadeh et al., 2018) Das bei Ischämie mit Sauerstoff unterversorgte und Abbauprodukt-reiche Gewebe reagiert auf die Veränderung mit der Expression und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. (Sivakumar et al., 2011, Ishida et al., 2003) Stickoxide, Zytokine und proteolytische Enzyme sorgen für eine Vasodilatation, eine Fenestrierung der Gefäße sowie eine Leukostase (Sivakumar et al., 2011) mit einhergehender Intensivierung der Hypoxie. (Adamis and Berman, 2008)

Wird der hohe Bedarf an Sauerstoff ischämiebedingt über längere Zeiträume nicht gedeckt, reagieren die Zellen der Netzhaut mit der Ausschüttung proangiogener Signalmoleküle. (Paternotte et al., 2008) Nachgewiesene

Bedeutung haben hier Transkriptionsfaktoren wie ein hypoxieinduzierter Faktor (HIF) (Vadlapatla et al., 2013), wachstums- und angiogenesestimulierende Faktoren wie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF), ein Perizytenstimulierender Wachstumsfaktor (PDGF), das Angiopoetin (ANG) und der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF). (Browning et al., 2008, Arden and Sivaprasad, 2011)

Der Prozess der Angiogenese wird auf zellulärer Ebene durch diese Moleküle, ihre Rezeptoren und ihre Signalwege reguliert. Allerdings ist die Gefäßproliferation komplex und durch zahlreiche intra- sowie extrazelluläre Signalwege modifizierbar. (Genet et al., 2019, Chen et al., 2009) Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg reguliert zum Beispiel die Expression von Genen im Zusammenhang mit der Organogenese (Chen and Ma, 2017) und hat eine entscheidende Rolle in der Entwicklung vaskulärer retinaler Strukturen. (Dejana, 2010) So beeinflusst er die Regulierung der Stammzellendifferenzierung, die Proliferation, das Überleben und die Migration sowohl in der Angiogenese als auch der Neurogenese. (Drenser, 2016) (de longh et al., 2006) Endotheliale Wnt-Signalaktivierung wird vor allem in Verbindung mit der Ausbildung und dem Ausbau der mikrovaskulären Versorgung des Auges und Gehirns gesehen. (de longh et al., 2006) Bezeichnend ist bei dieser Gefäßformierung die wichtige Ausbildung der Tight Junctions und der selektiven Membrantransporter für die Blut-Gehirn- sowie Blut-Retina-Schranke, auf die der Signalweg Einfluss nimmt. (Liebner et al., 2008, Phng et al., 2009) Die pathologische Fehlregulation des Wnt-Wegs ist assoziiert mit retinalen neovaskulären Erkrankungen. (Wang et al., 2019, Zhang et al., 2019) So konnte unter anderem eine Relation zwischen der Dysregulation der Glykolyse und einer verstärkten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität gefunden werden. (Shao et al., 2019) Auch für die Retinopathia praematorum werden Defekte des Signalwegs als Risikofaktor gesehen. (Wu et al., 2007, Bizzarro et al., 2006)

$\beta$ -Catenin ist ein konstitutiv exprimiertes Signalmolekül, dessen Abbau bei Aktivierung des Wnt-Rezeptors durch spezifische Proteine wie Wnts verhindert wird. (Nusse and Clevers, 2017) Wird der Wnt/Frizzled Rezeptor angeregt, erfolgt über eine Signalkaskade eine Blockade des Abbaus des intrazellulären  $\beta$ -Catenins und es akkumuliert sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. (Logan and Nusse, 2004) Das nukleär lokalisierte  $\beta$ -Catenin interagiert nun mit für die

Angiogenese wichtigen Transkriptionsfaktoren und induziert die Expression von spezifischen Signalmolekülen. (Martowicz et al., 2019) (Abbildung 4)

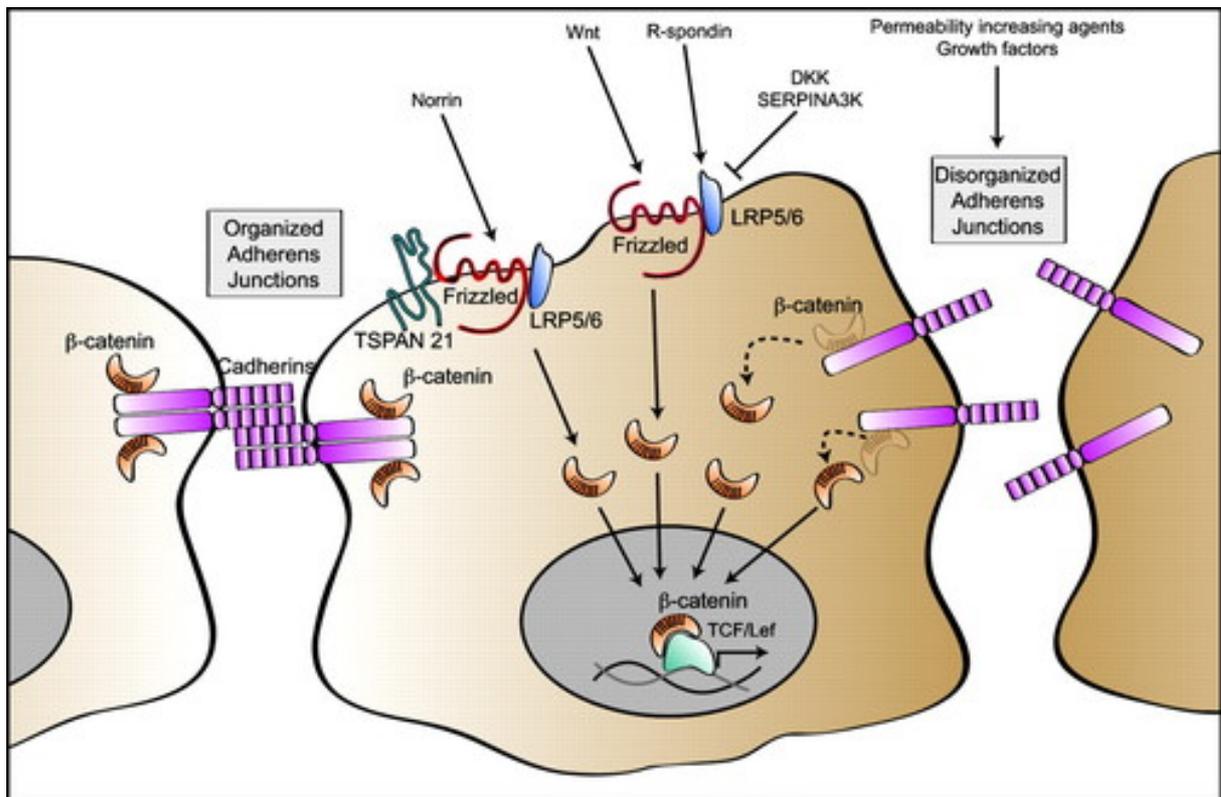


Abbildung 4: Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in endothelialen Zellen. Die Aktivierung des transmembranären Wnt/Frizzled Rezeptors führt zu einer Inhibition des  $\beta$ -Catenin Abbaus. Dieses akkumuliert und aktiviert intranukleär die Transkription angiogener Zielgene. (übernommen aus (Dejana, 2010))

### 1.5 Retinale vaskuläre Erkrankungen

Zu den Erkrankungen mit retinaler Neovaskulogenese zählen unter anderem die proliferative diabetische Retinopathie, die Retinopathia praematorum und die retinalen Venenverschlüsse. (Laouri et al., 2011, Prokofyeva and Zrenner, 2012) In der Schwangerschaft herrscht bei den Feten eine relativ hypoxische Umgebung zur Vaskulogenese. (Shah et al., 2016) Das retinale Gewebe ist in utero die ersten Wochen avaskulär, bevor sich vom Nervus opticus ausgehend die Gefäßplexi ausbilden. (Sun and Smith, 2018) Die Richtung des Gefäßwachstums folgt hierbei dem Hypoxiegradienten zwischen perfundierten und nicht-perfundierten Arealen -und der damit einhergehenden Ausschüttung von Wachstumsfaktoren- von zentral nach peripher. (Hughes et al., 2000) Frühgeborene kommen aufgrund der späten retinalen Vaskulogenese mit einer

unvollständig entwickelten retinalen Gefäßversorgung zur Welt, der peripheren avaskulären Zone. (Quimson, 2015) Bei einer Sauerstoffbehandlung von Frühgeborenen entfällt der physiologische Hypoxiegradient und somit auch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren; die Angiogenese wird dadurch angehalten. (Sun and Smith, 2018) Die fehlende Gefäßversorgung der Peripherie sorgt bei Absetzen der Sauerstoffbehandlung wiederum für eine Ischämie der Netzhaut, es werden nun erneut Wachstumsfaktoren ausgeschüttet und eine ungerichtete Gefäßproliferation folgt, die in schweren Fällen den hinteren Pol betreffen kann. (Quimson, 2015) Die daraus resultierende Fibrose und die Exsudationen können zu traktiven und exsudativen Ablationen führen. (Mutlu and Sarici, 2013, 1984)

Ischämische Venenverschlüsse entstehen aus retinalen Venenobstruktionen mit Blutstau und Verschluss des kapillären Netzwerkes. (Boyd et al., 2002) Die Ischämie des resultierenden hämorrhagischen Infarktes führt zu verminderter retinaler Perfusion und Hypoxie. (Grant and Lutty, 2013) Dies verursacht ebenfalls die oben beschriebenen neovaskulären Komplikationen. (Parodi and Bandello, 2009)

Bei der diabetischen Retinopathie liegt eine Mikroangiopathie der retinalen Gefäße vor. (Crawford et al., 2009, Kang and Yang, 2020) Sie führt verstärkt im peripheren Bereich der Netzhaut zu einem Verschluss der Gefäße mit retinalen Ischämiearealen. (Cuypers et al., 2000, Stitt et al., 2004) Die Ischämieareale können durch Sekretion proangiogener Faktoren zur Gefäßproliferation im gesamten Auge führen, welche durch Ödeme, Fibrose und traktive Ablationen zu zusätzlichen Komplikationen beitragen. (Ghosh and Collier, 2012, Kohner and Henkind, 1970)

Eine steigende Prävalenz findet sich bei der feuchten altersbedingten Makuladegeneration mit sekundären choroidalen und retinalen Neovaskularisationen. (Wong et al., 2014) Oxidativer Stress führt im Laufe der Lebenszeit zu rPE-Dysfunktion und steigender Permeabilität der Bruchmembran. (Biesemeier et al., 2014) Die entstehende metabolische Dysregulation durch Ablagerungen und Gewebsödeme und der chronisch inflammatorische Reiz führen zu einer retinalen und choroidalen Hypoxie. (Hollyfield et al., 2008) Eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren durch das rPE ist die Folge mit Anregung der retinalen und choroidalen Gefäßproliferationen. (Ricci et al., 2020)

## 1.6 Therapieoptionen der okulären Neovaskulogenese

Um den retinalen Gefäßproliferationen und ihren Komplikationen gegenzusteuern, gibt es bereits unterschiedliche, in der Klinik angewandte Therapieoptionen mit variierender Erfolgsrate. (Bowling et al., 2017)

### 1.6.1 Laserkoagulation

Bei der Laserkoagulation wird Lichtenergie auf die Netzhaut appliziert und vom retinalen Pigmentepithel absorbiert. (Su and Hubschman, 2017) Es kommt im Bereich der äußeren Netzhautschichten und der Choriokapillaris zu thermal induzierten Läsionen des Gewebes durch Denaturierung der Proteine und der daraus resultierenden Vernarbung. (Stefansson, 2001) Durch Ausschaltung von sauerstoffverbrauchendem Gewebe kommt es zu einer Reduktion der Ausschüttung von proangiogenen Faktoren und zu einer Einschränkung der Gefäßproliferation. (Su and Hubschman, 2017) Zudem erfolgt in der Theorie eine Verbesserung der Stoffwechselforgänge in den nichtkoagulierten Bereichen, da sich hierauf nun der Blutfluss konzentrieren soll. (Crawford et al., 2009, Romero-Aroca et al., 2014)

### 1.6.2 Anti-VEGF-Therapie

Die Antikörpertherapie gegen den Wachstumsfaktor VEGF ist heute meist die Therapie der Wahl bei retinalen pathologischen Gefäßproliferationen. (Tolentino et al., 2016, Eldweik and Mantagos, 2016, Spooner et al., 2019) Die bekanntesten Applikationen sind zu dem aktuellen Zeitpunkt das monoklonale Antikörperfragment Ranibizumab, der Antikörper Bevacizumab sowie das Fusionsprotein Aflibercept. (Eldweik and Mantagos, 2016, Campa et al., 2016, Virgili et al., 2018) Weitere Wachstumsfaktorhemmer befinden sich aktuell in der Zulassung. (Striglia et al., 2020) Die intravitreale Applikation der Wirkstoffe reduziert die Konzentration an freiem VEGF im Glaskörper und der Netzhaut. (Sawada et al., 2007) Den mikrovaskulären Zellen fehlt hierdurch der Stimulus zur Proliferation und Angiogeneseaktivität. (Campochiaro, 2015) Durch den ausbleibenden Stimulus kommt es zu keiner Gefäßproliferation, die Gefäße stabilisieren sich und die Tight Junctions nehmen zu. (Kohno et al., 2010)

## 1.7 hr-GAL1 und 3

Trotz vielfältiger Möglichkeiten bestehen weiterhin Limitationen und Nebenwirkungen der momentanen Therapien. (Hansen and Hartnett, 2019, Berger et al., 2015, Rodríguez et al., 2019) Bei allen Therapieoptionen ist eine anhaltende Aktivität bis hin zu einem Voranschreiten der Retinopathien möglich. (Duh et al., 2017) Die Anti-VEGF-Therapie besitzt keinen definierten Endpunkt bei anhaltender Krankheitsaktivität, wiederholte Injektionen mit möglichen Komplikationen und anfallenden Kosten sind oftmals notwendig und erfordern eine gewisse Compliance des Patienten. (Zhao and Singh, 2018) Bei der panretinalen Laserkoagulation sind ebenfalls visusmindernde Komplikationen wie peripherer Visusverlust und Makulaödem möglich. (Network, 2015) In diesem Zusammenhang ist es erforderlich, neue Optionen genauer zu betrachten und auf ihr klinisches Potential hin zu untersuchen. Aufgrund dessen haben wir uns näher mit humanem rekombinanten Galektin-1 und -3 (hr-GAL1 und 3) beschäftigt. (Luis et al., 2020)

### 1.7.1 Funktion der Galektine

Galektine gehören zu der Familie  $\beta$ -galaktosierender Proteine.  $\beta$ -Galaktosilierung spielt eine wichtige Rolle bei diversen inter- und intrazellulären Prozessen. (Laaf et al., 2018) Sie ist Bestandteil unterschiedlichster extra- sowie intrazellulärer Proteine. (Laaf et al., 2018) Ihre Komplexität führt dazu, dass manche ihrer Funktionen bis heute nicht vollständig erkannt und verstanden sind. (Obermann et al., 2017, Johannes et al., 2018) Der Einfluss der Galektine und ihrer  $\beta$ -Galaktosilierung ist auch abhängig vom Wirkungsort, d.h. dem zellulären und humoralen Umfeld. (Nio-Kobayashi, 2017) Die Wirkungsweise unterscheidet sich je nach Gewebeart und Krankheitsbild. (Chou et al., 2018, Mendez-Huergo et al., 2017)

Obwohl Galektin-1 (GAL1) und Galektin-3 (GAL3) sezernierte Proteine sind, (Seelenmeyer et al., 2005, Cummings et al., 2015, Davidson et al., 2006) die ihr Wirkungsspektrum zu großen Teilen im EZ und der äußeren Zellmembran haben, lassen sich beide auch intrazellulär und intranukleär nachweisen. (Davidson et al., 2006, Nakahara et al., 2006) Extrazelluläre Galektine modulieren unter anderem über Clustering von transmembranären Zellrezeptoren Signalwege oder beeinflussen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. (Priglinger et al., 2013, Obermann et al., 2017, Fujii et al., 2015) Im Zytoplasma sowie dem Zellkern

reagieren Galektine spezifisch mit Proteinen und steuern hierdurch ihre Wirkung, die Transkription von Zielgenen sowie Apoptosevorgänge. (Patterson et al., 2015, Haudek et al., 2009)

Die differierenden Lokalisationen und Interaktionen mit verschiedenen Proteinen führt zu komplexen, teils gegenläufigen Funktionen in Abhängigkeit von dem lokalen Milieu. (Cummings et al., 2015) Galektine beeinflussen durch ihre Variabilität an Interaktionen die Tumorbilogie, immunologische und entzündliche Prozesse, die Wundheilung sowie die neuronale Degeneration. (Fujii et al., 2015, Dos Santos et al., 2017, Cousin and Cloninger, 2016, Thomas and Pasquini, 2019) In der Retina lassen sich so unter anderem erhöhte Konzentrationen an Galektin-1 und -3 nachweisen bei der diabetischen Neuroinflammation. Mikroglia und Makrophagen werden hier im hyperglykämischen Status angeregt, zusammen mit anderen Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren auch Galektin-1 und -3 vermehrt zu exprimieren und sezernieren und so einen neurodegenerativen Prozess zu augmentieren. (Mendonca et al., 2020, Kanda et al., 2020b)

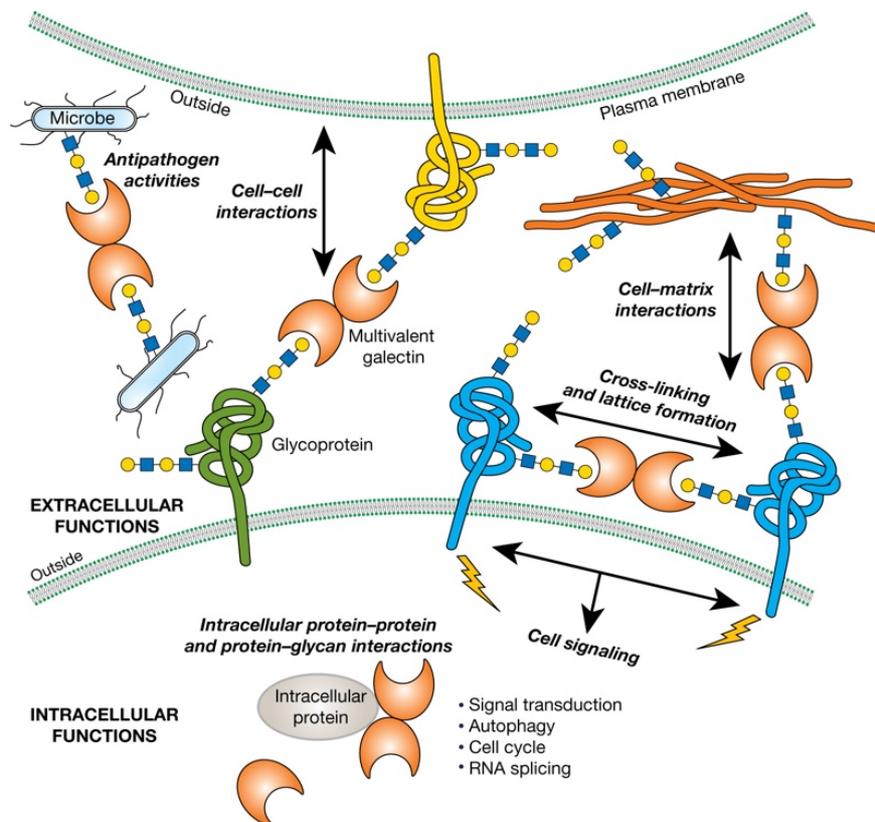


Abbildung 5: Galektin- Interaktions- und Bindungspartner. Galektine weisen intra- sowie extrazellulär multiple Bindungspartner, Interaktionen und somit Wirkungsweisen auf. (übernommen aus (Cummings et al., 2015))

### 1.7.2 Einfluss der Galektine auf okuläre Gefäßproliferationen

Das proangiogene Zusammenspiel zwischen dem Galektin und vaskulären Prozessen bei okulären Gefäßproliferationen wurde bereits in mehreren Studien gezeigt. (Luis et al., 2020) Erhöhte GAL1-Konzentrationen sind assoziiert mit diabetischer Retinopathie und kolokalisieren mit VEGF-Rezeptoren in der Retina und fibrovaskulären Membranen. (Ridano et al., 2017, Abu El-Asrar et al., 2020) So erwies sich die Menge an Galektin-1 in vitrealer Flüssigkeit bei Patienten mit proliferativer Retinopathie und vaskulärem Glaukom als stark erhöht. (Ridano et al., 2017) Galektine spielen innerhalb der Angiogenese eine Rolle bei der endothelialen Proliferation, der Migration, der Morphogenese und der vaskulären Permeabilität. (Crocì et al., 2014) In einem Mausmodell mit sauerstoffinduzierter Retinopathie zeigten sich die GAL1-Mengen als gestiegen. Die Expression des Galektin-1 fand vorwiegend in der Retina statt und lagerte sich entlang neovaskulärer Falten an. Hypoxie-bedingt zeigt sich bei rPE Zellen eine deutliche Zunahme der Galektin-1 Expression. (Yamamoto et al., 2021) Bei Galektin-1 Knock-out Mäusen zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Gefäßproliferationen. (Ridano et al., 2017, Yang et al., 2017a) Ein Galektin-1-Inhibitor erwies sich im gleichen Modell ebenfalls wirksam in der Inhibition neovaskulärer Strukturen. (Yang et al., 2017a) Die Inhibition von Galektin-3 erreichte äquivalent dazu die Reduktion kornealer Gefäßproliferationen in einem Mausmodell. (Chen et al., 2017) Geringe Konzentrationen an exogenem Galektin-3 regten die Bildung neovaskulärer Strukturen im Mausmodell hingegen an. (Canning et al., 2007)

Im Gegensatz hierzu finden sich vermehrt Hinweise darauf, dass rekombinantes GAL bei Zugabe von exogenem GAL andere Wirkungspotentiale aufweisen kann als endogenes GAL. (Alge-Priglinger et al., 2009, Priglinger et al., 2013) In einer vorausgegangenen Arbeit wurde der inhibitorische Effekt exogen zugegebener humaner Galektine-1 und -3 (hr-Gal1 und 3) auf die Zelladhäsion retinaler Pigmentepithelzellen (rPE) beobachtet. (Alge-Priglinger et al., 2009) Synchron dazu konnten mehrere andere Studien die hemmende Wirkung exogenen Galektins in Pathologien nachweisen, in denen endogenes Galektin gegenläufig dazu krankheitsprogressiv wirkte. (Fujii et al., 2015, Alge et al., 2006, Perone et al., 2009, Mello-Bosnic et al., 2018, Perez et al., 2015, Karlsson et al., 2008, Zanon Cde et al., 2015, Toscano et al., 2006) So zeigten diese Studien, dass die Inhibition des endogenen Galektin-1 oder -3 eine protektive Wirkung auf

verschiedene Entzündungsprozesse und die Wundheilung aufwies. Gleichwertige Ergebnisse konnten hier allerdings auch durch die exogene Zugabe von rekombinantem Lektin erzielt werden. (Fujii et al., 2015, Alge et al., 2006, Perone et al., 2009, Mello-Bosnic et al., 2018, Perez et al., 2015, Karlsson et al., 2008, Zanon Cde et al., 2015, Toscano et al., 2006) Zudem ergab sich ein deutlich inhibitorischer Effekt bei Konzentrationen zwischen 10 und 160 µg/ml von rekombinantem Galektin-1 auf die Proliferation humaner Fibroblasten, epithelialer Karzinomzellen, Osteosarkomazellen und hämatopoetischer Stammzellen. (Adams et al., 1996) (Vas et al., 2005) Die Galektin-1-Blutplasmakonzentrationen im Menschen variierten zwischen 20 ng/ml in Gesunden und 650 ng/ml in Patienten mit epitheliale Ovarialkarzinom. (He et al., 2017) (Chen et al., 2015) Ähnlich variierende Konzentrationen wurden für Galektin-3 mit 7 ng/ml bei der Normalbevölkerung und 950 ng/ml bei Patienten mit metastasiertem Krebs gefunden. (He et al., 2017, Iurisci et al., 2000) Die inhibitorische Wirkung der exogenen Galektine lässt sich also bei viel höheren Konzentrationen beobachten als solche unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen.

### 1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist nun die Untersuchung des Einflusses rekombinanten Galektins-1 und -3 (hr-GAL1 und 3) auf humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMEC) unter permissiven Bedingungen. (2016) Die hr-GAL1 und 3 wurden hierfür zunächst in *Escherichia coli* überexprimiert und isoliert. Anschließend wurde ihre Wirkung auf die angiogenen Eigenschaften der Endothelzellen *in-vitro* betrachtet. Die Auswirkungen auf zelluläre Eigenschaften sowie auf mögliche Wirkungswege wurden hierbei näher beleuchtet. (Hillenmayer et al., 2022)

## 2 Methoden

### 2.1 Zellkultur

Für alle folgenden *in-vitro* Versuche wurden primäre humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMEC; Pelobiotech GmbH, Planegg, Deutschland) in den Passagen 2-6 genutzt. Die Kultivierung der HRMEC erfolgte als Monolayer auf Zellkulturplastik in Nunc™EasYFlask™ 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) unter Standardzellkulturbedingungen im Inkubator (HeraCell 150, Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Sättigung. Zur Kultivierung wurde mikrovaskuläres endotheliales Zellwachstumsmedium (Pelobiotech) mit Supplement-Mix (Pelobiotech), 2 % fötalem Kälberserum (FKS, Pelobiotech) sowie 50 IU Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml versetzt. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Kontrolle der Zellqualität erfolgte täglich unter dem inversen Phasenkontrastmikroskop (Leica DM IL, Leica, Wetzlar, Deutschland). Das Passagieren und die Subkultivierung erfolgte bei Konfluenz der Zellen mit Ethylendiamintetraessigsäure 1:5000 in PBS (Versene, Thermo Fisher Scientific) und einer Subkultivierungsratio von 1:2 bis 1:3., die den einzelnen Experimentabläufen vorausgehenden Versuchsaufbauten erforderten teilweise unterschiedliche Zelldichten und Inkubationszeiten.

Für die immunologischen Färbungen wurden die HRMEC auf runden Deckglasplättchen mit 15 mm Durchmesser (Thermo Fisher Scientific) ausgesät und bis zur vollständigen Zellkonfluenz kultiviert. Die Behandlung der Zellen erfolgte dann mit jeweils 100 bzw. 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3 für 2 und 24 Stunden im Inkubator. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die lediglich mit supplementiertem Medium inkubiert wurden.

Um für die Zellproliferationsanalyse BrdU ELISA die Proliferation der Zellen im Zeitraum der Behandlung zu gewährleisten, wurde eine Zellzahl von  $1,2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> gewählt. Die HRMEC wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, (Absher, 1973) in 96-Well Platten ausgesät und für die vollständige Adhärenz vor Versuchsbeginn für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentrationsschemata wurden zugegeben und zusammen mit der Labelingsolution folgte eine 72-stündige Behandlungsphase.

Für die zweite Proliferationsanalyse, die WST-1 Analyse, wurden die HMREC mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und ebenfalls eine Adhärenzzeit von 24 Stunden gewählt. Die Inkubation mit den jeweiligen hr-GAL Konzentrationen folgte für 48 Stunden.

Das Migrationsverhalten wurde unter anderem mittels Time-Lapse-Mikroskopie betrachtet. Die Zellen wurden hierfür mit einer Dichte von  $1 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf 12-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden inkubiert.

Bei der Detektion der Toxizität ging für die Zelladhärenz eine 24-stündige Inkubationszeit in 96-Well Platten bei einer Zelldichte von  $1,8 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> voraus, bevor die Zugabe des hr-GAL für 72 Stunden ausgeführt wurde.

Für den immunologischen Nachweis der Toxizität wurden als Versuchsgruppen jeweils die höchsten genutzten Konzentrationen von 120 µg/ml von hr-GAL1 oder 3 in supplementiertem Medium etabliert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1,2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den runden Deckglasplättchen von 15 mm Durchmesser ausgesät und 24 Stunden für die Adhärenz inkubiert. Anschließend folgte für 72 Stunden die Behandlung mit hr-GAL1 oder 3.

## 2.2 hr-GAL1 und 3

Die Herstellung der rekombinanten hr-GAL wurde freundlicherweise von Prof. Geerlof (Helmoltz Zentrum München, Deutschland) übernommen. Die Expression und Isolierung des hr-GAL1 und 3 erfolgte in E-coli Bakterien (Priglinger et al., 2013) und wird hier nur kurz zusammengefasst wiedergegeben. pETM-11/hgalectin1 und pETM-11/hgalectin3 (hergestellt von G. Stier, European Molecular Biology Laboratory) wurden in den E. coli Stamm BL21 (DE3) (New England Biolabs, Massachusetts, USA) transferiert und bei 20 °C in 2-Liter Flaschen mit 500 ml ZYM 5052 Auto-Induktions Medium und 100 µg/ml Kanamycin (Merck, Darmstadt, Deutschland) kultiviert. (Studier, 2005) Nach Erreichen eines vollständigen Sättigungsstadiums wurden die Zellen zentrifugiert und anschließend in 30 ml Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 µg/ml DNase1, 1 mM AEBSF.HCl, 0.03% (v/v) CHAPS, 1 mg/ml Lysozym, pH 7.5) resuspendiert und mittels Ultraschall lysiert. Zur Reinigung der Lysate wurden diese zentrifugiert (40000 x g) und filtriert. Der so entstandene Überstand wurde auf 2 ml Lactose-Agarose-Chromatographiesäulen (J-Oil Mills, Tokyo, Japan) aufgetragen, die mit Puffer A (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.03% (v/v) CHAPS, pH 7.5) neutralisiert wurden. Gebundene Proteine

wurden nach dreimaliger Waschung mit 25 ml Puffer A mit je 5 ml des 0.2 M Lactose enthaltendem Puffer A gelöst. Insgesamt wurde das Proteinlösen zweimal wiederholt, bevor die Protein-enthaltenden Anteile zusammengefasst und über Nacht bei 4 °C gegen 1 Liter PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Gibco, Paisley, England) dialysiert wurden. Die entstandene Lösung wurde gefiltert und anschließend bei 4° C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Dialysat erfolgte die Absorption bei 280 nm mit Verdünnung der hr-GAL mittels PBS (Gibco).

Für weitere Versuchsschritte war eine Biotinilierung der hr-GAL1 und 3 notwendig und erfolgte nach Herstellerangaben mittels EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin Kit (Thermo Fisher Scientific). 500 µg hr-GAL1 oder 3 wurden hierbei für 2 Stunden bei Raumtemperatur entweder mit 40 µl oder 80 µl Sulfo-NHS-Biotin (10 mM) inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung nach erfolgter Markierung mittels 1xPBS (Biochrom) bei 4 °C über Nacht mittels einer Slide-A-Lyzer Dialysekassette dialysiert, um überschüssige Biotin-Moleküle vor dem weiteren Einsatz zu entfernen.

### 2.3 Versuchsgruppen

In den folgenden Experimenten dieser Arbeit wurden lediglich die zugegebenen Konzentrationen der rekombinanten hr-GAL verändert; alle anderen Variablen des Mediums und der relative Anteil an zugegebenen 1xPBS (PBS Dulbecco, Biochrom, Berlin, Deutschland) blieben für die Versuchsgruppen gleich. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden die Zellen jeweils mit 30 µg/ml, 60 µg/ml und 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3 in mit Wachstumsfaktor und 2 % FKS versetztem Medium behandelt. Für die Positivkontrolle wurde ein mit Wachstumsfaktor und FKS versetztes Medium genutzt und die Behandlung der Negativkontrolle erfolgte mit Medium ohne Wachstumsfaktoren und ohne FKS.

Um eine mögliche Exozytose sowie proteasomale Zersetzung der Galektine zu blockieren, wurden die HRMEC zunächst für 12 Stunden entweder mit 10 µM Brefeldin A inkubiert, einem Inhibitor des exozytotischen Stofftransports, oder mit 5 µM Epoxomicin, einem kovalenten Bindungspartner katalytischer Untereinheiten von Proteasomen (beide Selleckchem, Texas, USA). Die Inkubation erfolgte gemäß der Versuchsbeschreibung für endotheliale Zellen. (Jung et al., 2012, Bargagna-Mohan et al., 2006)

## 2.4 Immunfluoreszenz

Nach der Behandlung der HRMEC mit den Lektinen wurde dreimal für jeweils 5 Minuten mit 1xPBS (Dulbecco, Biochrom) gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die folgenden Waschschriffe wurden dreimal für 5 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer (0,1 M Psp, 1:1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O in aqua des.) durchgeführt. Es folgte die Inkubation der fixierten Zellen für 30 Minuten mit 3 % Bovinem Serum Albumin und 0,1 % Triton X in 0,1 M Psp (Blockerpuffer) bei Raumtemperatur, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern und zugleich eine bessere Permeabilität der Zellmembranen zu erreichen. Ohne weiteren Waschschriff begann die nächste Inkubation mit den primären Antikörpern 1:50 in Blocko (1:10 Blockerpuffer in 0,1 M Psp) über Nacht bei 4 °C. Für GAL1 diente ein monoklonaler Kaninchenantikörper (EPR3205, Abcam, Cambridge, England) als primärer Antikörper, für GAL3 ein monoklonaler Ratten-Antikörper (125401, Biolegend, San Diego, Kalifornien). Zur Detektion von  $\beta$ -Catenin wurde ein monoklonaler 6B3-Kaninchenantikörper (#9582, Cell Signaling, Danvers, Massachussets, USA) verwendet und für die Membran-Lokalisationsfärbungen ein polyklonaler Kaninchen Anti-MCT-1 Antikörper (ab93048, Abcam). Nach weiteren drei Waschschriffen mit 0,1 M Psp folgte die Behandlung mit den sekundären Antikörpern. Die primären Antikörper für Galektin-1 und  $\beta$ -Catenin wurden mit einem Ziegen Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 555 Antikörper (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornien, USA), der MCT-1 Antikörper mittels Ziegen Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen) und die Plättchen für Galektin-3 mit einem Esel Anti-Ratte IgG Alexa Fluor 488 Antikörper (Invitrogen) detektiert. Die Visualisierung der biotinierten hr-GAL1 und hr-GAL3 erfolgte mittels Markierung durch 1:1000 Streptavidin Alexa Fluor 488. Inkubiert wurde in einer Verdünnung von jeweils 1:10 in Blocko für 120 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler. Zum Ausschluss unspezifischer Immunmarkierung der sekundären Antikörper wurden HRMEC ohne vorherige Inkubation mit primärem Antikörper lediglich mit dem sekundären Antikörper behandelt. Nach weiteren drei Waschschriffen wurden die Zellkerne mittels Hoechst 33342 (Invitrogen) in einer Dilution von 1:2000 in 0,1 M Psp angefärbt, gefolgt von finalen drei Waschschriffen. Die Konservierung der Färbungen mit VECTASHIELD Antifade Mounting Medium für Fluoreszenz (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) und die Eindeckelung auf Objektträgern schloss sich an. Analysiert und dokumentiert

wurden die Immunfärbungen mit einem Axio Observer 7 Mikroskop mit Apoptome Modul zur Erstellung optischer Schnitte (Zeiss, Jena, Deutschland) und ZEN Software (Zeiss). Die Quantifizierung des intrazellulären Galektin-1 und -3 Fluoreszenzsignals in der Kontroll- und Behandlungsgruppe erfolgte anhand des Apoptome Moduls. Für alle Aufnahmen eines Experiments wurden hierbei jeweils dieselben Aufnahmeeinstellungen gewählt. Für die Messung der Densitometrie wurde das perinukleäre Zytoplasma in der ZEN Software markiert und die Intensität des Fluoreszenzsignals pro Fläche berechnet. Pro HRMEC Gruppe und Versuch erfolgte die Auswertung für je 10 perinukleäre Areale und ihre Quantifizierung relativ zu der Kontrollgruppe.

## 2.5 Zellproliferation

### 2.5.1 BrdU

Der hr-GAL1 und 3-Einfluss auf die Proliferation der HRMEC wurde mithilfe eines Zellproliferations-ELISA, 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ermittelt. (Perry and Wolff, 1974, Sugiyama et al., 1976) Es handelt sich hierbei um eine quantitative Messung der Zellproliferation, basierend auf der Inkorporation von BrdU in die DNA sich teilender Zellen, die mittels ELISA-Technik detektiert wird.

Die BrdU-Labeling Solution wurde bereits bei Inkubationsbeginn für 48 Stunden in der Konzentration 1:1000 zu den Behandlungsgruppen zugegeben. Die Auswertung der Analyse erfolgte anschließend nach Ablauf der Inkubationszeit mit hr-GAL1 und 3. Die Zellen wurden 30 Minuten fixiert, 90 Minuten mit Anti-BrdU Antikörpern inkubiert und nach drei Waschschritten mit dem Enzymsubstrat versetzt. Die ablaufende Reaktion wurde nach 5 Minuten mittels  $H_2SO_4$  gestoppt und die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenz bei 690 nm auf dem SpectraMax 190 (Molecular Devices, San Jose, Kalifornien, USA). Alle Messungen wurden für die Auswertung gegen die Positivkontrolle normiert.

### 2.5.2 WST-1

Um die Proliferation in einem unabhängigen Test zu bestätigen, wurde ein kolorimetrischer Farbumschlagtest (WST-1; 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitro -

phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzenedisulfonate) (Roche Diagnostics) verwendet. (Peskin and Winterbourn, 2000b, Peskin and Winterbourn, 2000a) WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz, das von den Mitochondrien verstoffwechselt wird. Proliferation, Zellüberleben und metabolische Aktivität der Zellen bestimmen hierbei die Menge des Substratumsatzes. (Altman, 1976)

Für die Analyse erfolgte die Zugabe des WST-1 nach Ablauf des Behandlungszeitraumes und vor weiteren 2 Stunden Substratinkubation. Die Messung der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit der Referenz von 690 nm vorgenommen. Alle Versuchsgruppen wurden gegen die Positivkontrolle normiert.

## 2.6 Zellmigration

### 2.6.1 Wundinduzierte-Migrationsanalyse

Der Einfluss der rekombinanten hr-GAL1 und 3 auf die Zellmigration der HRMEC wurde ebenfalls durch zwei unabhängige experimentelle Verfahren untersucht. Bei der Wundinduzierten-Migrationsanalyse wurde die Migration durch Messung der rekolonialisierten Fläche bestimmt. (Kassumeh et al., 2018, Liang et al., 2007)

Die Kultivierung der HRMEC erfolgte bis zur vollständigen Konfluenz des Zellrasens. Anschließend wurden jeweils fünf zellfreie Areale pro Untersuchungsgruppe parallel zueinander mit einer 100 µl Pipettenspitze (Eppendorf, Wesseling-Bertzdorf, Deutschland) in den Zellrasen gekratzt. Zur Entfernung von Zelldebris und loser Zellen folgte die zweimalige Spülung mit 1xPBS (Biochrom) und die zellfreien Areale wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop (Leica DM IL, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit Digitalkamera (Leica Dfc295) und zugehöriger LAS-Software Version 3.6 (Leica) zum Zeitpunkt t=0 dokumentiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden wie in den oben beschriebenen Versuchsgruppen inkubiert und am Ende dieser Zeit erneut fotodokumentiert. Die Auswertung der Differenz der zellfreien Flächen erfolgte mittels Image J Version 1.52k (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Der prozentuale Unterschied der mit Zellen bewachsenen Fläche wurde aus den Bildern vor Inkubation und nach Inkubation berechnet. Alle Versuchsgruppen wurden gegen die Positivkontrolle normalisiert.

### 2.6.2 Time-Lapse Mikroskopie

Als weitere Migrationsuntersuchung wurde die Time-Lapse Mikroskopie gewählt. Es erfolgte hierbei während der Behandlung mit hr-GAL1 oder hr-GAL3 eine automatisierte Bildaufnahme der migrierenden Zellen mittels Mikroskops mit angeschlossener Digitalkamera, Inkubationskammer und motorisierter XYZ-Plattform über den definierten Inkubationszeitraum. Anschließend erfolgt die Auswertung der gesammelten Bildsequenzen in numerische Daten. (Vogt et al., 2018, Wertheimer et al., 2014) Die Dokumentation begann innerhalb der ersten 10 Minuten nach Inkubationsstart mit automatischem, inversem Phasenkontrastmikroskop mit Digitalkamera (Axiovert100, Zeiss) mit 20 x Vergrößerung im integrierten Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Pecon, Erbach, Deutschland). Die Aufnahmen erfolgten in 10-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Für die Auswertung wurden die generierten Bilder mittels der ZEN Software (Zeiss) in JPEG Dateien konvertiert. Es erfolgte eine Dokumentation der xy-Koordinatenposition von jeweils 80 Zellen für alle experimentellen Gruppen zu definierten Zeitpunkten für eine Einzelzellverfolgung mithilfe der manuellen Zelltracking Software Plug-ins MTrackJ, (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Erik Meijering, Universität Rotterdam, Niederlande) in Image J 1.52k (NIH). Anhand der Daten konnte eine Rekonstruktion der Vektorenrichtung ausgehend von den Koordinatenursprüngen stattfinden. Dies erlaubte die Analyse mittlerer Zellmigrationsdistanzen und Geschwindigkeiten einzelner Zellen. Im Vektordiagramm wurde das koordinierte und gerichtete Zellmigrationsverhalten verglichen, indem die Anfänge der Zellbahnen auf den Koordinatenursprung gesetzt wurden. (Masuzzo et al., 2016)

### 2.7 Adhäsion

Der Einfluss der hr-GAL auf die Zelladhärenz wurde anhand einer Adhäsionsanalyse näher betrachtet. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation direkt als jeweilige Versuchsgruppe in einer Konzentration von  $1 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> resuspendiert, in 12-Well Platten ausgesät und inkubiert. Die Dokumentation der Zelladhärenz mittels Phasenkontrastmikroskops (Leica DM IL) mit Digitalkamera (Leica) erfolgte in den Zeitintervallen 15, 30, 60 und 120 Minuten mit jeweils drei gewählten Ausschnitten der einzelnen Versuchsgruppen pro Experiment. Die Anzahl der adhärennten Zellen pro Ausschnitt wurde quantifiziert und die

Auswertung relativierte die jeweilige Anzahl der adhärennten Zellen zu der Gesamtzahl aller gezählten Zellen.

## 2.8 Bildung von kapillarähnlichen Strukturen

Um den Einfluss der Lektine hr-GAL1 und hr-GAL3 auf die *in-vitro* Bildung kapillarähnlicher Strukturen zu untersuchen, wurde eine endotheliale Zellkapillarstruktur-Analyse in der 3D-Zellkultur untersucht. (Arnaoutova et al., 2009)

Um den Prozess der tubulären Kapillarformierung *in-vitro* darzustellen, nutzt man basalmembranähnliche Matrixgele aus extrazellulären Komponenten, in denen sich die Endothelzellen zu Gefäßstrukturen formieren können. Cultrex PathClear Basement Membrane Extract (BME, Trevigen, Maryland, USA) diente als EZM-Äquivalent. Das BME wurde nach Herstellerangaben über Nacht bei 8°C aufgetaut, anschließend wurden 156 µl BME/cm<sup>2</sup> für 30 Minuten in dem Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. 4.7x10<sup>4</sup> HRMEC Zellen/cm<sup>2</sup> wurden nach Zählung mit der Neubauer Zählkammer in 100 µl des jeweiligen Mediums in die BME-haltigen 96-Well Platten zugegeben. Die Etablierung der Versuchsgruppen erfolgte einheitlich zu den anderen Versuchen. Nach 4 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre folgte die fotografische Dokumentation der endothelialen kapillarähnlichen Strukturen mit dem Phasenkontrastmikroskop (Leica) mit Digitalkamera (Leica) und zugehöriger LAS-Software 3.6 (Leica). Für die Auswertung der Bilder wurde Image J 1.52k (NIH) und GNU Image Manipulation Program (GIMP) Version 2.10 (das Gimp Team, Universität Berkley, California, USA) verwendet. Quantifiziert wurden die kapillarähnlichen Strukturen anhand der Fläche der gebildeten vaskulären Formationen und in Relation gesetzt zu der Fläche der unbehandelten, supplementierten Kontrollgruppe. Zell-Zell-Kontakte mit einer Breite größer als 70 µm galten als tubuläre Struktur. (Staton et al., 2009)

## 2.9 Zelltoxizität der hr-GAL

### 2.9.1 Nachweis von Histon-DNA-Komplexen

Um Zelltoxizität als Ursache des beobachteten Effekts auf die Endothelzellen in den Experimenten auszuschließen, wurden mögliche apoptotische und nekrotische Vorgänge unter Galektineinfluss evaluiert. Apoptotische Vorgänge

unter Lektinbehandlung wurden anhand eines photometrischen Enzymimmunoassays (Cell Death Detection ELISA Plus, Version 14, Roche) gegen Histon-DNA-Komplexe betrachtet. Die Quantifizierung erfolgt bei dem ELISA durch Messung der Histonkomplex-DNA Fragmente. Die Durchführung des ELISAs erfolgte gemäß Herstellerangaben. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Lyse der Zellen im Inkubationspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten zentrifugiert ( $1 \times 10^4$  U/min) und der Überstand mit der Anti-DNA peroxidasehaltigen Immunoreagenz in Inkubationspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur in mit Anti-Histonantikörpern beschichteten Wells inkubiert. Nach drei Waschschrinen erfolgte die Zugabe des ABTS Substrats für eine 10-minütige Inkubationszeit auf dem Rüttler. Die Reaktionsstärke wurde mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 405 nm auf dem SpectraMax 190 (Molecular Devices) mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm gemessen.

### 2.9.2 Detektion avitaler Zellen

In einer unabhängigen Untersuchung wurden HRMEC mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 und für die Färbung von Zellkernen mit permeabler Membran mit Propidiumiodid (Invitrogen) behandelt. Als Versuchsgruppen wurden jeweils die höchsten genutzten Konzentrationen von 120  $\mu\text{g/ml}$  von hr-GAL1 oder 3 in supplementiertem Medium etabliert. Als Kontrolle dienten in diesem Fall unbehandelte Zellen, die nach Ablauf des Inkubationszeitraumes für 10 Minuten mit Methanol behandelt wurden.

Die Färbung der Zellen erfolgte mittels Inkubation mit Hoechst 33342 1:2000 und Propidiumiodid 1:1000 in supplementiertem Medium für 15 Minuten. Nach dreimaligem 5-minütigem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen mit 4% PFA für 10 Minuten fixiert und mit VECTASHIELD Antifade Mounting Medium für Fluoreszenz auf Glasplättchen eingedeckelt und konserviert. Die Dokumentation der Zellkernfärbungen wurde mit Hilfe des Axio Observer 3 Mikroskops und ZEN Software vorgenommen.

## 2.10 Proteinpräparation und Western Blot Analyse

Die Quantifizierung des intrazellulären  $\beta$ -Catenins erfolgte in einer Western Blot Analyse nach Protein-Auftrennung mittels SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE). (Laemmli, 1970, Smith, 1984) Hierfür

wurde zunächst das zu untersuchende zelluläre Gesamtprotein, das  $\beta$ -Catenin, isoliert, die Konzentration bestimmt und das SDS-Gel hergestellt. (Mahmood and Yang, 2012)

Die zuvor für 24 Stunden mit 120  $\mu\text{g/ml}$  hr-GAL1 oder 3 behandelten Zellen wurden mit eiskaltem 1xPBS (Biochrom) gewaschen, gesammelt und anschließend mittels protease- und phosphatase-haltigem RIPA Puffer (Roche) lysiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 Minuten. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins erfolgte anschließend mittels BCA-Analyse. 10  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Proteinproben wurden hierfür in der Standardkonzentration unverdünnt sowie 1:5 und 1:10 verdünnt auf eine 96-Well Platte übertragen. Eine Rinderserumalbumin-Stammlösung in verschiedenen Konzentrationen diente als Kontrolle. Eine Standarddeichkurve wurde aus reiner Stammlösung gebildet. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung (Interchim, Wörgl, Österreich) folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 37 °C. Die abschließend photometrisch gemessene Extinktionsbestimmung bei 560 nm in dem SpectraMax 190 (Molecular Devices) ließ daraufhin eine Konzentrationsabschätzung mittels Mittelwertberechnung zu.

Das SDS-Gel besteht aus Trenngel ( $\text{dH}_2\text{O}$ , Rotiphoresegel 30%, Tris/HCl 1,5M pH 8,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) und Sammelgel ( $\text{dH}_2\text{O}$ , Rotiphoresegel, Tris-HCl 1M pH 6,8, 10%SDS, 10%APS, TEMED). Das Trenngel wurde zunächst zwischen zwei Glasplatten gegossen, mit Isopropanol beschichtet und für 30 Minuten belassen. Nach vollständiger Polymerisation folgte die Zugabe des Sammelgels. Mittels Plastikamm wurden die für die Proteinproben notwendigen Taschen in dem flüssigen Gel geschaffen und ebenfalls bis zu dem Erreichen seiner Festigkeit ruhen gelassen. Das so vorbereitete Gel wurde nun in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Puffertank mit Elektrodenpuffer (Tris Base, Glycin, 0,1% SDS) befüllt und die Taschen mit den Proben beladen. Bis zu 15  $\mu\text{g}$  des isolierten Proteins (15  $\mu\text{l}$ ) wurde hierbei mit 5  $\mu\text{l}$  des 4 x SDS Puffer (Tris-HCL, 8%SDS, 0,4% Bromophenolblau, Glycerol, 2M DTT) auf das 10% SDS-Gel gegeben. Für die Auftrennung wurden jeweils 20 Minuten lang eine Spannung von 80 Volt und weitere 40 Minuten eine von 180 Volt angelegt und die Proteine auf Basis ihres Molekulargewichts auf dem Trenngel separiert. Das

Sammelgel wurde anschließend entfernt und das Trenngel für die weiteren Schritte des Blottings genutzt.

Mittels Semidry-blotting wurden die separierten Proteine auf Polyvinylfluorid (PVDF) Membranen (Roche) mit 25 Volt für 75 Minuten transferiert. Die Membranen waren zuvor mit Methanol hydrophilisiert und anschließend für 5 Minuten mit Transferpuffer (Tris Base, Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol) getränkt worden. Dem Übertragen der Proteinbanden auf die Membranen folgten die Schritte des Waschens und Inkubierens für den immunologischen Nachweis. 5% Magermilch in PBS-T (PBS, 0,1% Tween) dienten der Blockierung überschüssiger Antigene durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden anschließend über Nacht bei 4°C mit Kaninchen Anti- $\beta$ -Catenin Antikörpern (Cell Signaling) in der Verdünnung 1:1000 oder Ziege Anti- $\alpha$ -tubulin Antikörpern (R&D System, Minneapolis, USA) in der Verdünnung 1:5000 in PBS-T mit 0,5 % BSA inkubiert. Es folgten zunächst dreimal 10-minütige Waschschritte mit PBS sowie einmalig für 5 Minuten mit PBS-T (PBS, 0,2% Tween). Als sekundäre Antikörper dienten AP-konjugierte Huhn Anti-Kaninchen oder Huhn Anti-Ziege Antikörper, 1:2000 verdünnt in PBS-T (PBS, 0,2% Tween) und 0,5% BSA. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden mit Waschpuffer (NaCl, Maleinsäure, 0,3% Tween) dreimalig für 10 Minuten gewaschen und anschließend mit Detektionspuffer (Tris-HCL, NaCl) für 5 Minuten behandelt. Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte anschließend mittels CDP-Star Substrat (Roche) und wurde unter Zuhilfenahme des iBrightCL1000 Imaging System (Thermo Fischer) dokumentiert. Um die relative Expression des  $\beta$ -Catenins quantifizieren zu können, wurde die Signalstärke der  $\beta$ -Catenin-Bande zu der des  $\alpha$ -Tubulins ins Verhältnis gesetzt und die relative  $\beta$ -Catenin-Expression bestimmt.

## 2.11 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung wurde zunächst für alle Graphen und Rechnungen anhand von EXCEL 365 Version 16 (Microsoft, Redmond, Washington) und GraphPad PRISM 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien) durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte nach Errechnung des Mittelwertes und des Standardfehlers des arithmetischen Mittels. Vergleiche der Mittelwerte wurden anhand eines einfachen ANOVA-Tests durchgeführt. Für die Daten, die die Annahme der Homogenität der Varianzen erfüllten, folgte als Post-Hoc Test der

LSD-Test zur Analyse des kleinsten signifikanten Unterschieds. Daten, die die Kriterien der Homogenität der Varianzen nicht erfüllten, wurden anhand des Games Howell Tests verglichen. Als signifikant galt immer ein P-Wert < 0.05. In der graphischen Darstellung wurden p Werte <0.05 mit \* markiert, p<0.01 mit \*\* und p<0.001 mit \*\*\*. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des arithmetischen Mittels dar.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lokalisation von Galektinen in den Endothelzellen

Rekombinante hr-GAL beeinflussen die zelluläre Reaktion der HRMEC über Bindung an deren Zellmembran sowie über die Regulierung ihrer intrazellulären Aktivität. (Cummings et al., 2015) Eine zelluläre Reaktion der HRMEC auf die rekombinanten hr-GAL erfolgt durch Bindung dieser an die Endothelzellen. Um die Lokalisation von Galektinen nach Behandlung der HRMEC mit hr-GAL1 und 3 zu untersuchen, erfolgten Färbungen der Proteine mittels Immunfluoreszenz. Die unbehandelten Kontrollgruppen wiesen lediglich ihr endogenes Galektin auf, welches durch Färbung nachgewiesen wurde, während inkubierte Zellen sowohl für endogenes wie auch rekombinantes Galektin-1 bzw. Galektin-3 fluoreszent markiert wurden. Das endogene Galektin stellte sich vor allem im perinukleären Zytoplasma immunfluoreszent dar, sowie in geringen Mengen im Zellkern selbst. Die Exposition gegenüber hohen Konzentrationen an hr-GAL1 oder 3 führte zu einem verminderten Signal des Proteins im Zytoplasmabereich. Im Vergleich zu den Kontrollen fanden sich die Galektine bereits nach 2 Stunden Inkubation stattdessen verstärkt extrazellulär sowie an der Zellmembran.

*(Abbildung 6A und B)*

Die Quantifizierung zeigte in Relation zu der Kontrollgruppe eine Reduktion des perinukleären zytoplasmatischen Fluoreszenzsignals bis auf 16 % für Galektin-1 ( $0.16 \pm 0.27$ ,  $p < 0.001$ ,  $n=30$ ) und 78% für Galektin-3 ( $0.78 \pm 0.45$ ,  $p=0.05$ ,  $n>30$ ). Nach 24 Stunden Behandlung fand sich intrazellulär nur noch ein geringes Signal für Galektin-1 und -3. Das Fluoreszenzsignal für Galektin-1 zeigte sich nun weiterhin signifikant niedrig ( $0.19 \pm 0.19$ ,  $p < 0.001$ ,  $n=30$ ), bei Galektin-3 ergab sich eine zusätzliche Reduktion ( $0.64 \pm 0.58$ ,  $p=0.002$ ,  $n>30$ ).

*(Abbildung 6A, B und D)*

Um nachvollziehen zu können, ob das hr-GAL1 oder 3 durch die Endothelzellen intrazellulär aufgenommen wird oder extrazellulär an die Zellmembran bindet, wurden die HRMEC für 2 Stunden mit biotiniliertem hr-GAL1 und 3 inkubiert und dieses anschließend mit Alexa Fluor 488- gekoppelten Streptavidin dargestellt. Sowohl für biotiniliertes hr-GAL1 als auch hr-GAL3 wurde ein moderates, aber spezifisches Signal angrenzend oder kolokalisierend zu dem

Monokarboxylasetransporter-1 (MCT-1), einen spezifischen Marker der Zellmembran, festgestellt. (Abbildung 6C)

In der Fokalebene des Zytoplasmas ließ sich kein Fluoreszenzsignal nachweisen, was die Annahme verstärkt, dass sowohl hr-GAL1 als auch hr-GAL3 an der Zellmembran der mikrovaskulären Endothelzellen binden, jedoch nicht internalisiert werden. (Abbildung 6C)

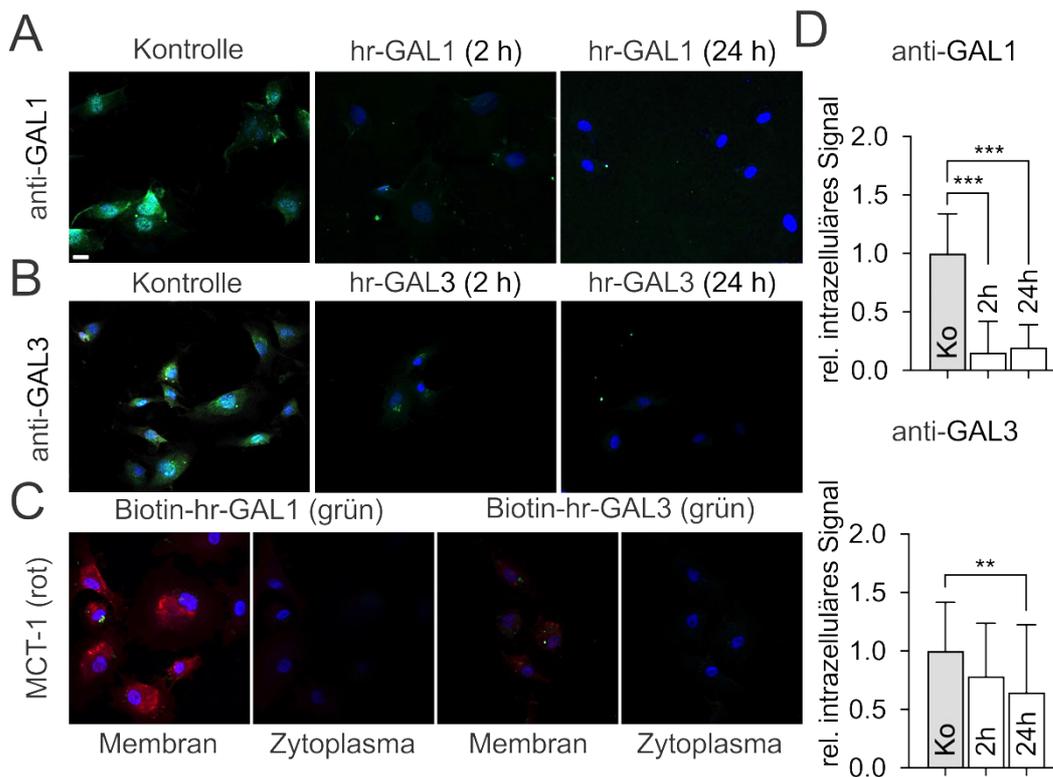


Abbildung 6: Lokalisation und Bindung von Galektin-1 oder -3 an HRMEC nach Inkubation.

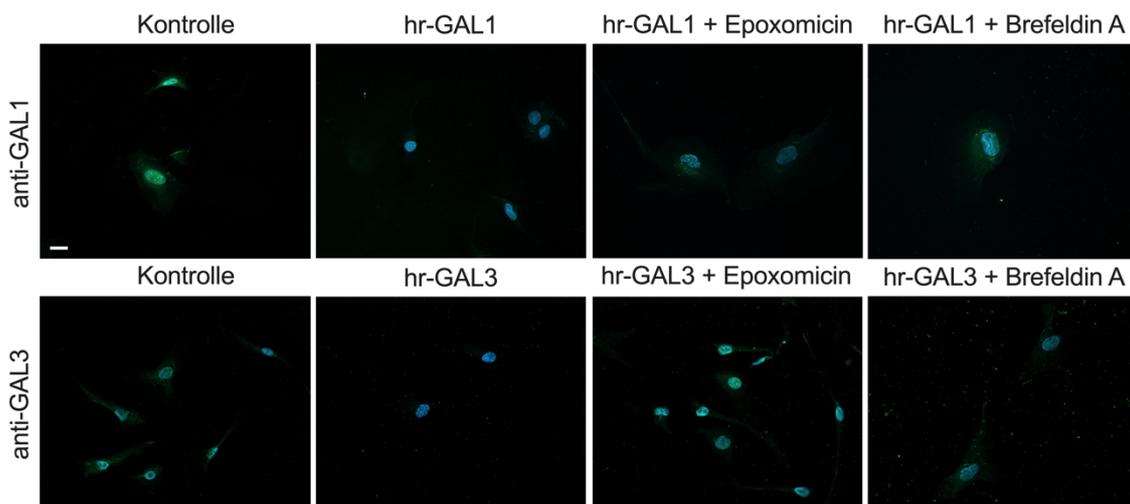
Immunologische Färbung der HRMEC nach 2 und 24 Stunden Inkubation mit 120 µg/ml hr-GAL1 (A) oder 3 (B). Detektion des biotinierten hr-GAL1 und 3 (grün) nach 2-stündiger Inkubation der HRMEC und immunfluoreszente Färbung für MCT-1 (rot) als Zellmembranmarkierung (C). Membran, Fokalebene der Membran; Zytoplasma, Fokalebene des Zytoplasmas. Vergrößerungsbalken in A-C, 20 µm, Blau: Hoechst-Zellkernfärbung.

D. Darstellung des intrazellulären Fluoreszenzsignals von Galektin-1 und -3 in der unbehandelten Kontrollgruppe sowie den mit hr-Gal1 und hr-Gal3 inkubierten HRMEC. Quantifizierung und Darstellung als relatives Fluoreszenzsignal.

\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; n=30 aus 3 unabhängigen Experimenten.

Es wurde nun auch noch der Mechanismus der intrazellulären Galektin-1 und -3 Reduktion näher untersucht. Die HRMEC wurden hierfür zusätzlich zu ihrer Inkubation mit hr-GAL1 oder 3 für 12 Stunden mit bzw. ohne Epoximicin, einem Inhibitor der proteasomalen Degradation, oder Brefeldin A, einem Exozytose-Inhibitor, behandelt.

Wie oben beschrieben verringerte die Behandlung der HRMEC mit hr-GAL1 und 3 die intrazellulären Mengen an Galektin-1 und -3. Wurden die Zellen allerdings neben hr-GAL1 mit Epoximicin oder Brefeldin A inkubiert, so zeigte sich bei beiden Versuchsgruppen ein verstärkt nachweisbares Signal für Galektin-1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit reiner hr-GAL1 Behandlung. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch nach Inkubation der HRMEC mit hr-GAL3 mit sowie ohne gleichzeitige Behandlung mit Epoximicin oder Brefeldin A. (*Abbildung 7*)



*Abbildung 7:* Hr-GAL1 und 3 verringern die intrazelluläre Galektin-1 und -3 Konzentration über Exozytose und proteasomale Zersetzung.

Immunologische Färbung der HRMEC für Galektin-1 und -3 nach 12-stündiger Inkubation mit 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3 sowie mit oder ohne 5 µm Epoxomycin, einen Inhibitor der proteasomalen Zersetzung, oder Brefeldin A, einen Inhibitor der Exozytose. Vergrößerungsbalken, 20 µm; Blau: Hoechst-Zellkernfärbung.

Insgesamt unterstützen unsere Ergebnisse somit die These, dass die Reduktion des intrazellulären Galektin-1 und -3 nach Behandlung mit hr-GAL1 bzw. 3

sowohl auf eine Exozytose als auch auf proteasomale Degradation zurückzuführen sein könnte.

## 3.2 Einfluss der hr-GAL auf die Eigenschaften retinaler Endothelzellen

### 3.2.1 Inhibition der Zellproliferation

Die Zellproliferationsentwicklung nach Zugabe von hr-GAL1 oder 3 wurde mittels der beiden Analysen BrdU Elisa und WST-1 unabhängig voneinander betrachtet. Im BrdU ELISA zeigte die 48-stündige Inkubation der HRMEC mit hr-GAL1 und 3 in supplementiertem Zellkulturmedium eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der Zellproliferation (Kontrolle vs alle hr-GAL1 und 3 Konzentrationen:  $p < 0.001$ ). Im Vergleich zur unbehandelten, FKS-supplementierten Kontrollgruppe (pos Ko) zeigte die Behandlung mit 120  $\mu\text{g/ml}$  hr-Gal1 oder 3 eine 52% bzw. 37% Inhibition der Zellproliferation. (*Abbildung 8A*) Wird das Wachstum der Behandlungsgruppen mit HRMEC im Wachstumsfaktor-freiem Medium der negativen Kontrollgruppe (neg Ko) verglichen, so zeigte sich eine 1,3 fache sowie 2,1-fache Zunahme der Zellproliferation unter hr-Gal1 oder 3 Inkubation. Die positive Kontrollgruppe wies eine 2,4-fach erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zur negativen Kontrolle auf. (*Abbildung 8A*)

Es erfolgte eine unabhängige Bestätigung der gemessenen Proliferationshemmung der HRMEC durch Inkubation mit hr-GAL1 und 3 mittels Messung des intrazellulären NADH Wertes im WST-1 Assay. (*Abbildung 8B*) Nach dreitägiger Inkubation der HRMEC zeigte sich ein dosisabhängig verminderter Metabolismus des WST-1. Die wachstumshemmende Wirkung zeigte sich am prominentesten nach Inkubation mit 120  $\mu\text{g/ml}$  hr-GAL1 oder 3 mit einer signifikanten Reduktion des WST-1-Umsatzes auf 45% bzw. 65% verglichen zu der positiven Kontrolle (Ko vs alle hr-GAL1 und 3 Konzentrationen:  $p < 0.001$ ). (*Abbildung 8B*) Beide unabhängigen Untersuchungen deuten somit auf eine proliferationshemmende Wirkung der hr-GAL auf HRMEC *in-vitro* hin.

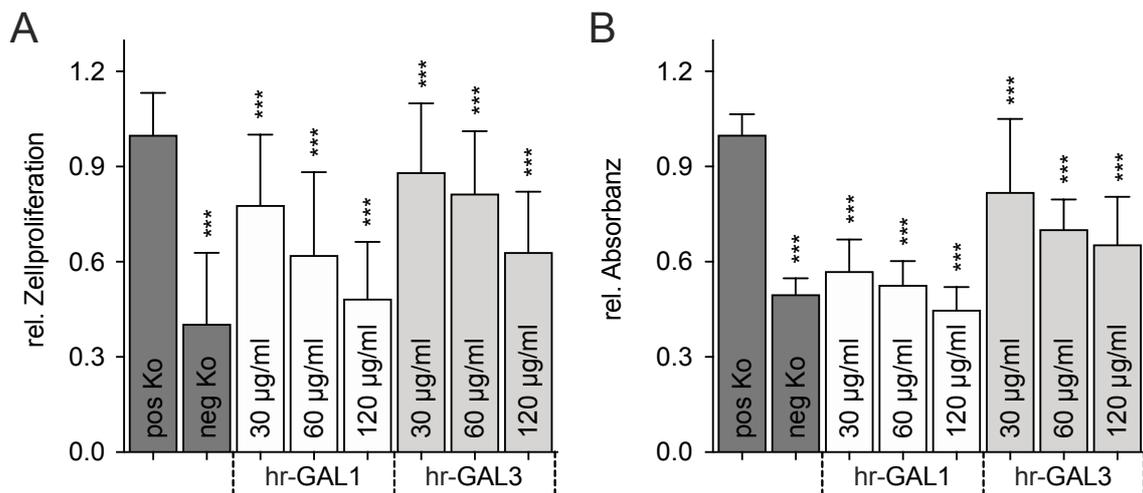


Abbildung 8: Zellproliferationshemmung der HRMEC durch hr-GAL1 und 3 *in vitro*.

BrdU ELISA (A) und WST-1 (B) Analysen zeigen den Einfluss der Inkubation mit 30, 60 und 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3 für 48 Stunden (BrdU) und 72 Stunden (WST-1). \*Ko vs alle hr-GAL1 und 3 Konzentrationen: \*\*\*p<0.001; BrdU n=40 für 5 unabhängige Experimente, WST-1, n=32 für 4 unabhängige Experimente.

### 3.2.2 Hemmung der Migration durch hr-GAL1 und 3

Neben der Proliferation stellt auch die Migration von Endothelzellen einen entscheidenden Faktor zur Bildung von neuen Gefäßen dar. Aufgrund dessen wurde der Einfluss der beiden Lektine auf die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen mittels zweier unabhängiger experimenteller Ansätze quantifiziert.

In der Wundinduzierten-Migrationsanalyse wiesen behandelte Zellen 24 Stunden nach Wundinduktion und Beginn der Inkubation mit hr-GAL1 und 3 eine geringere wiederbesiedelte Fläche auf als die neu proliferierten Kontrollzellen. (Abbildung 9A)

Verglichen zu der Positivkontrolle waren die Flächen der behandelten Gruppen signifikant weniger bewachsen (pos Ko vs hr-GAL1 60 µg/ml: p=0.01, vs hr-GAL1 120 µg/ml: p=0.001, pos Ko vs alle hr-GAL3: p<0.01) und wiesen eine geringere Zelldichte auf der Wundfläche auf. Eine Inkubation mit 120 µg/ml hr-Gal1 oder 3 in wachstumsfaktorhaltigem Medium reduzierte die wieder kolonisierte Zellfläche um 31% und 44% im Vergleich zur positiven Kontrolle. (Abbildung 9B)

Da in Wundverschlussexperimenten nicht nur die Migration betrachtet wird, sondern auch die Proliferation der HRMEC eine Rolle spielen könnte, wurde die Migration der Zellen zusätzlich mittels Time-Lapse-Mikroskopie untersucht. Anhand der manuell verfolgten Migrationswege wurde die mittlere Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Behandlungsgruppen bestimmt. Unter Einfluss der beiden Galektine zeigte sich über den Verlauf der dokumentierten Zeitintervalle von 24 Stunden eine signifikant niedrigere mittlere Geschwindigkeit (Ko vs alle hr-GAL:  $p < 0.5$ ). (*Abbildung 10A*)

Die Behandlung mit 120  $\mu\text{g/ml}$  hr-GAL1 oder 3 reduzierte die gesamte mittlere Geschwindigkeit um 32% bzw. 21% verglichen zur unbehandelten Positivkontrolle. (*Abbildung 10B*) Weiterhin wurde die Einzelzellbewegung bezüglich einer gerichteten Migration untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die gerichtete Migration durch die Galektine beeinträchtigt wird. Die Behandlung führte im Vergleich zur Positivkontrolle zu weniger sowie weniger gerichteten Bewegungen. (*Abbildung 10C*)

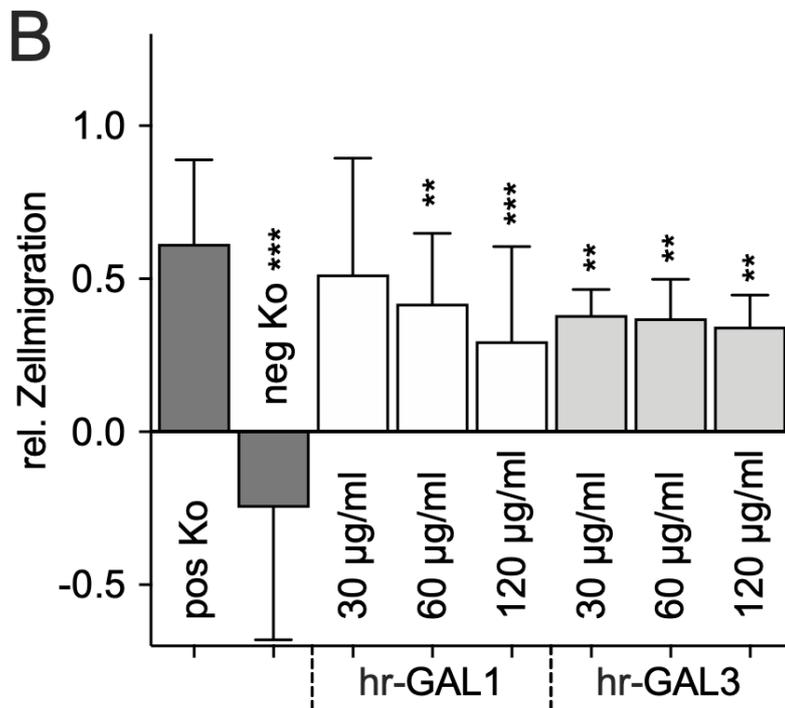
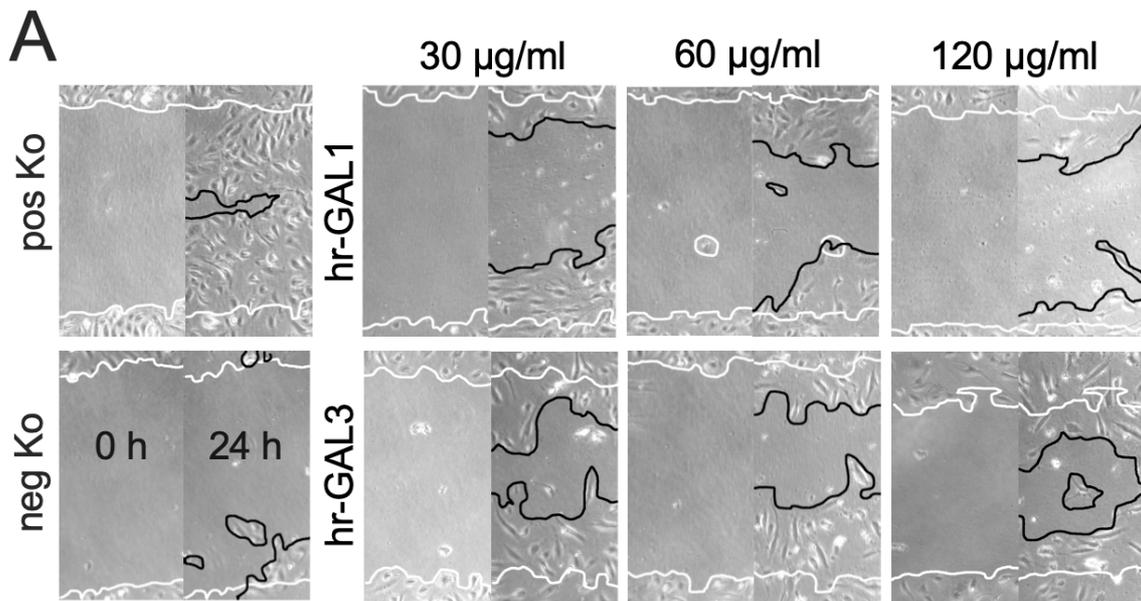
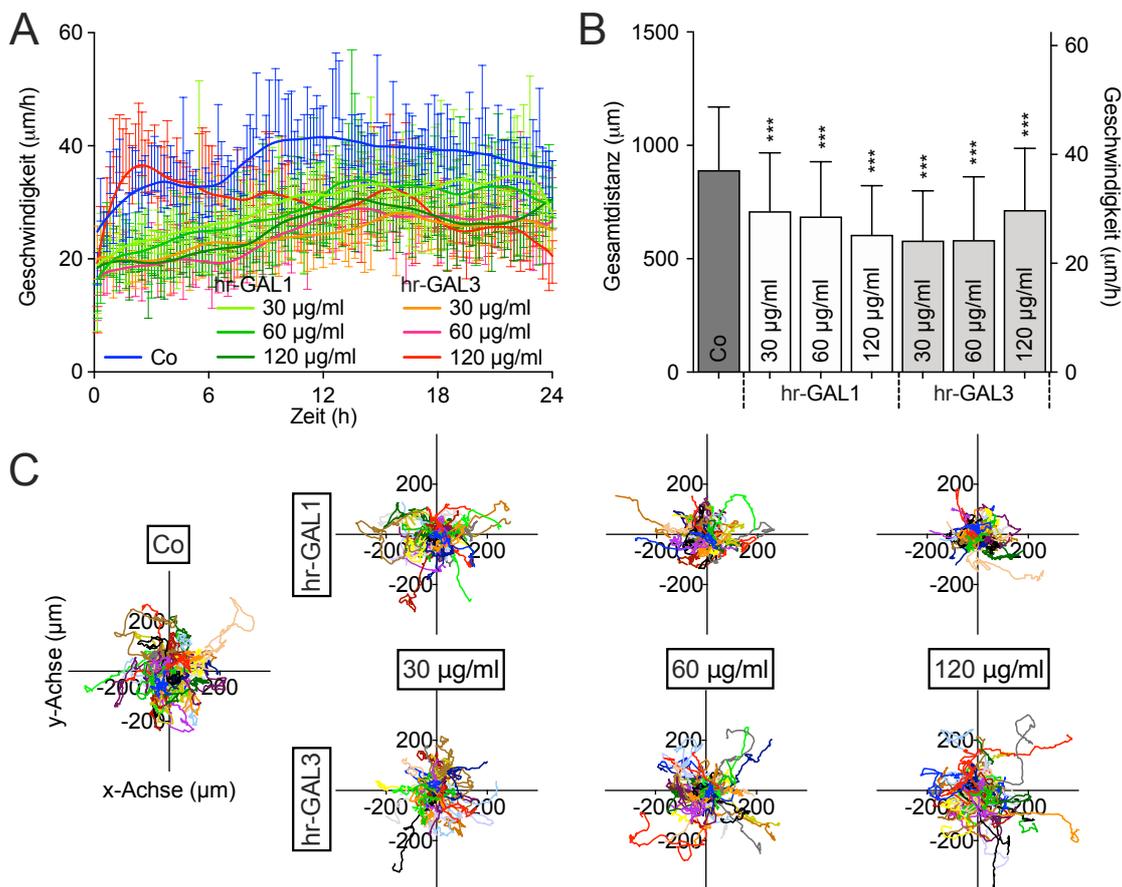


Abbildung 9: Inhibition der Zellmigration durch hr-GAL1 und 3 *in-vitro*. Wundinduzierte-Migrations Analyse (A) und Quantifizierung der Migration (B) nach 24 Stunden Inkubation der HRMEC mit hr-GAL1 oder 3 in den Konzentrationen 30, 60 und 120 µg/ml. \*pos Ko vs alle behandelten Zellen oder neg Ko, \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 20$  für 4 unabhängige Experimente.



**Abbildung 10:** hr-GAL1 und 3 verlangsamen die Zellgeschwindigkeit und gerichtete Direktionalität der Endothelzellen *in-vitro*.

Quantifizierung der Time-Lapse Mikroskopie bezüglich der durchschnittlichen Zellgeschwindigkeit zu den jeweiligen Zeitintervallen (A), die durchschnittliche Zellgeschwindigkeit (B) sowie Einzelzellverhalten (C) während der 24 Stunden Inkubation mit 30, 60 und 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3. Jede Farbe repräsentiert ein Zellbewegungsmuster in (C). \*Ko vs alle hr-GAL für die Zellgeschwindigkeit: \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 60$  für 3 unabhängige Experimente.

### 3.2.3 Hemmung der Zelladhäsion

Für die Migration sowie die Bildung von neuen Gefäßen ist die Adhäsion von Endothelzellen mitentscheidend. Aufgrund dessen wurde die Adhäsion von HRMEC unter Einfluss von hr-GAL im Medium *in-vitro* quantifiziert. Die Anzahl adhärenter Zellen sowie die Gesamtzahl aller Zellen wurde 15, 30, 60 und 120 Minuten nach Aussähen dokumentiert und als relative adhärente Zellzahl dargestellt. Nach 2 Stunden waren in der unbehandelten Positivkontrolle 80 % der Zellen adhären. Die Anwesenheit von entweder hr-GAL1 oder 3 führte hingegen dosisabhängig zu signifikant niedrigeren adhäsiven Zellzahlen mit einer

Reduzierung der Adhäsion um 50% bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{g/ml}$  hr-GAL1 bzw 120  $\mu\text{g/ml}$  hr-GAL3 (Ko vs hr-GAL1 60  $\mu\text{g/ml}$  und 120 $\mu\text{g/ml}$ :  $p<0.5$ , vs hr-GAL3 120  $\mu\text{g/ml}$ :  $p=0.001$ ). (Abbildung 11). Dies deutet darauf hin, dass hr-GAL1 und 3 die Zelladhäsion inhibieren können.

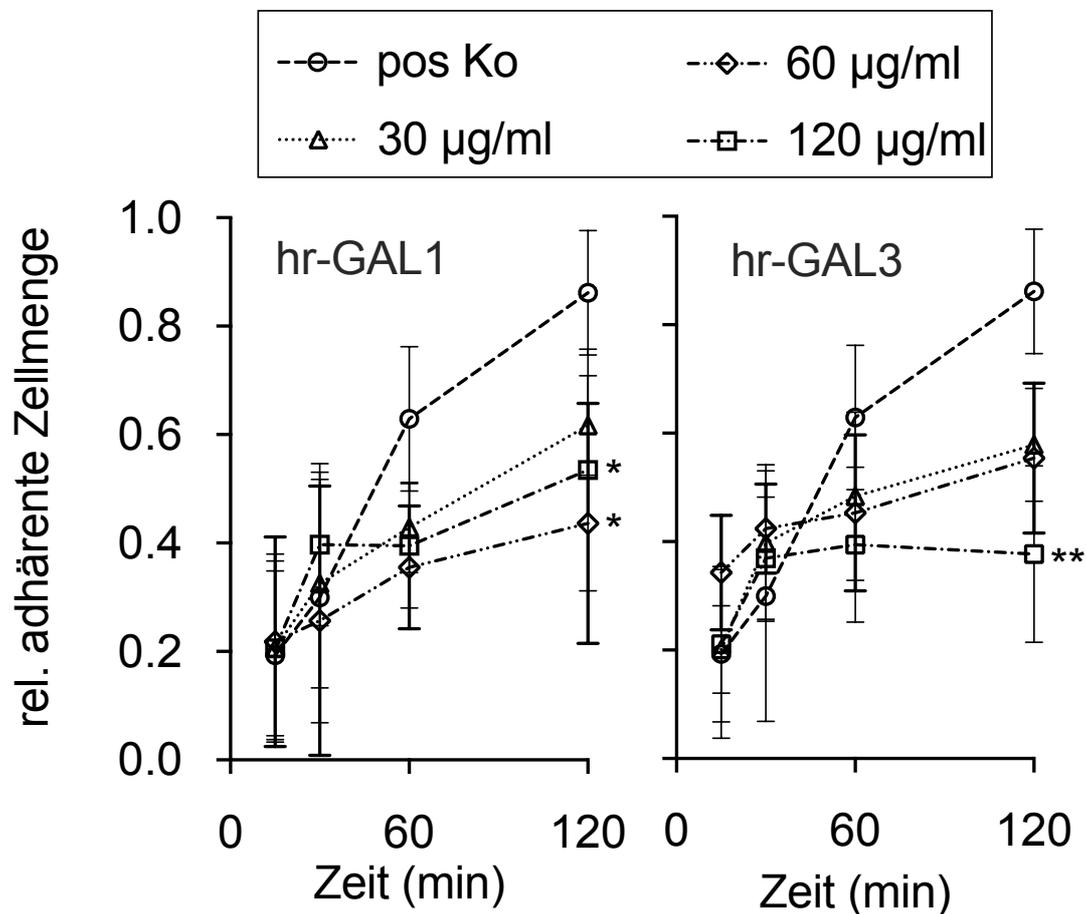


Abbildung 11: Adhäsion der HRMEC wird durch hr-GAL1 und 3 *in-vitro* verringert. Die relative Zelladhäsion der HRMEC wurde unter Inkubation mit 30, 60 oder 120  $\mu\text{g/ml}$  hr-GAL1 oder 3 nach 15, 30, 60 und 120 Minuten quantifiziert. \*pos Ko vs hr-GAL1 oder 3; \* $p<0.05$ , (vs hr-GAL1 60  $\mu\text{g/ml}$ :  $p=0.021$ , vs hr-GAL1 120  $\mu\text{g/ml}$ :  $p=0.036$ ) \*\* $p<0.01$  (vs hr-GAL3 120  $\mu\text{g/ml}$ :  $p=0.01$ );  $n=9$  von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.4 Inhibition der Bildung von kapillarähnlichen Strukturen

Um den Einfluss von hr-GAL1 und 3 auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen zu untersuchen, wurden die HRMEC auf eine EZM ausgesät und mit den Galektinkonzentrationen 30, 60 und 120  $\mu\text{g/ml}$  für 4 Stunden inkubiert. Kapillare Strukturen mit einer Breite von mehr als 70  $\mu\text{m}$  wurden in ihrer Fläche quantifiziert und in Relation zu der Negativkontrolle in Wachstumsfaktorfreiem

Medium gestellt. Die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an hr-GAL1 und 3 für 4 Stunden führte zu signifikant kleineren Gefäßarealen (pos Ko vs alle hr-GAL:  $p < 0.001$ ). Verglichen zu der Positivkontrolle verringerte sich die umfassende Fläche der Gefäßstrukturen unter hr-GAL1 und 3 Behandlung auf 35% und 7% der Kontrollfläche. (Abbildung 12A und B) Dies unterstützt die Vermutung der Inhibition der Gefäßformierung.

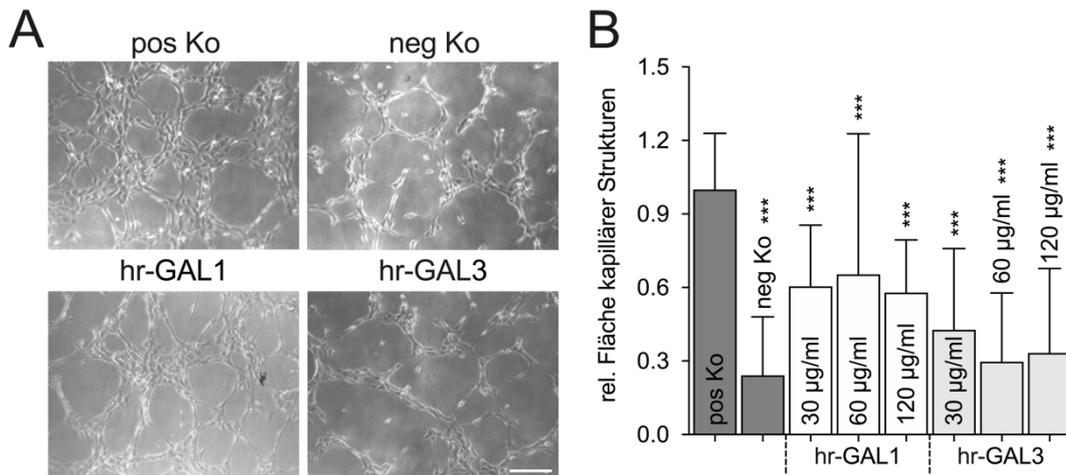


Abbildung 12: hr-GAL blockieren die Bildung von kapillar-ähnlichen Strukturen *in vitro*.

Kapillare Gefäßformation nach 4-stündiger Inkubation in wachstumsfaktorfreien (neg Ko) oder wachstumsfaktorhaltigen Medium ohne (pos Ko) oder mit 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3 (A). Flächenquantifizierung der kapillar-ähnlichen Strukturen mit mindestens 30 µm Breite nach 4-stündiger Inkubation mit hr-GAL1 oder 3 und ihre Darstellung in Relation zu der Positivkontrolle. (B) \*pos Ko vs alle hr-GAL: \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 24$  aus 4 unabhängigen Experimenten. Vergrößerungsbalken: 200µm

### 3.2.5 Zelltoxizität von hr-GAL1 und 3 auf HRMEC

Mehrere Analysen legen den Schluss nahe, dass hohe Konzentrationen an hr-GAL1 und 3 auf HRMEC und deren angiogene, neovaskuläre Eigenschaften *in vitro* einen inhibitorischen Effekt besitzen. Aufgrund dessen sollte ausgeschlossen werden, dass die erhobenen Befunde durch einen toxischen Effekt der hr-GAL vermittelt werden. Hierfür wurde zunächst ein Zelltoddetektions-ELISA durchgeführt.

In der Negativkontrolle ohne FKS war 72 Stunden nach Inkubation eine signifikant höhere Menge an Histonkomplex-DNA Fragmenten nachweisbar.

Verglichen zu der Kontrolle mit serumhaltigem Medium war die nachgewiesene Menge in der unsupplementierten Kontrollgruppe um das 2,7-fache erhöht. Innerhalb der mit Galektin behandelten Gruppen, inkubiert mit serumhaltigem Medium, ließ sich jedoch kein toxischer Effekt mit Apoptoseinduktion nachweisen. Die relative Histon-Komplex Menge zeigte für keine der Versuchsgruppen eine signifikante Änderung der Absorptionsraten um den Faktor 1 verglichen zu der Kontrollgruppe mit Wachstumsfaktor (pos Ko vs alle hr-GAL:  $p > 0.5$ ). (*Abbildung 13A*)

Weiterhin wurde unabhängig der ELISA Ergebnisse und zur visuellen Darstellung eine Hoechst/Propidium Iodid Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Positivkontrolle, behandelt mit Methanol, zeigte die Anfärbung vieler Kerne toter Zellen mit Propidiumiodid. Die Färbung der Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit 120 µg/ml hr-GAL1 und 3 lies hingegen keine erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen verglichen zu der unbehandelten Kontrolle erkennen. (*Abbildung 13B*) Somit liegt der Schluss nahe, dass die hohen Konzentrationen an exogenem Galektin-1 und -3 keine toxische Wirkung auf HRMEC *in-vitro* ausüben und die zuvor beobachteten Befunde nicht auf einen toxischen Effekt von hr-GAL1 und 3 zurückzuführen sind.

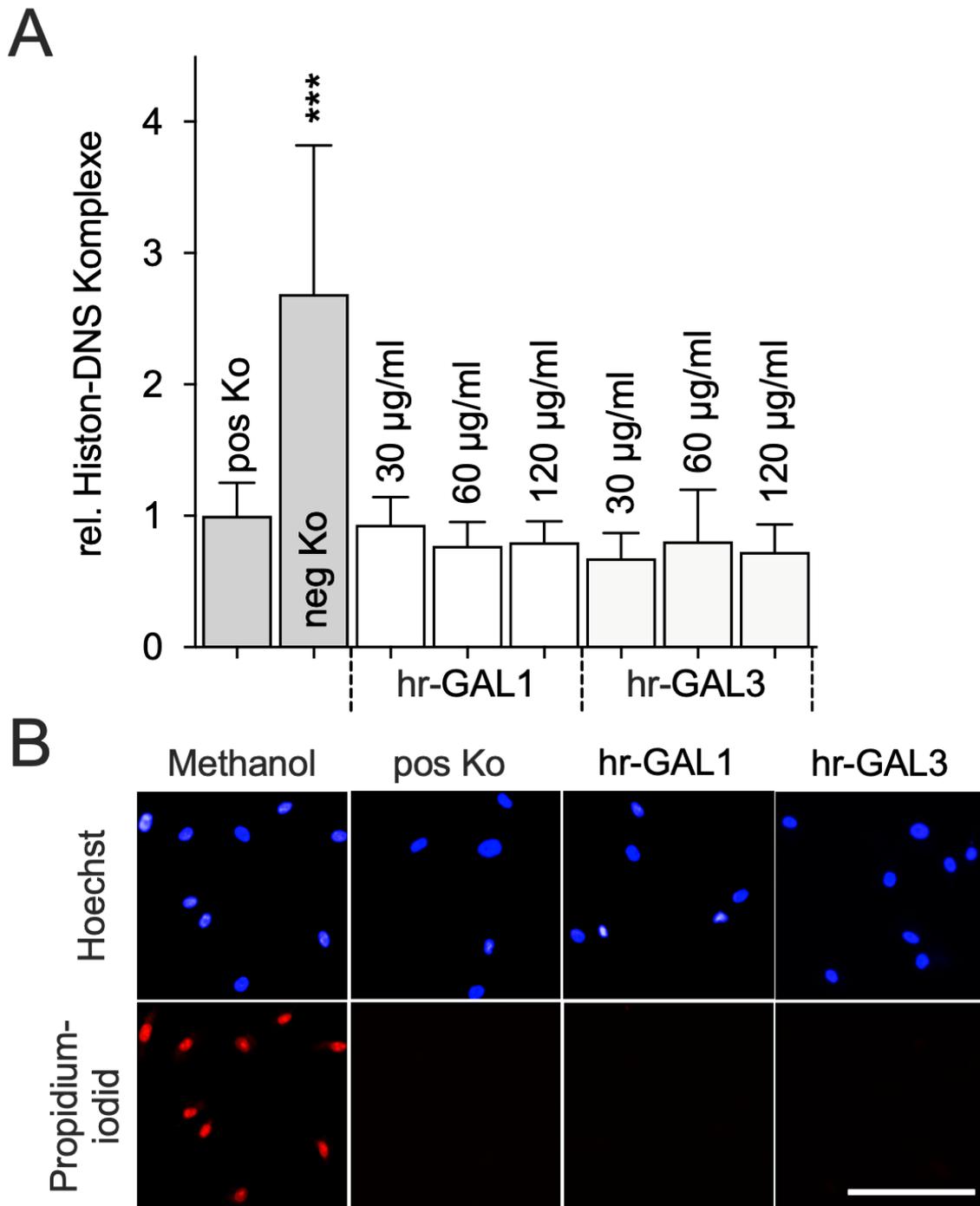


Abbildung 13: hr-GAL1 und 3 zeigen in-vitro keine toxischen Auswirkungen auf HRMEC.

Relative Mengen an Histon-DNA Komplexen nach 72-stündiger Inkubation ohne wachstumsfaktorhaltigem (neg Ko) bzw mit wachstumsfaktorhaltigem Medium ohne (pos Ko) sowie mit hr-GAL1 oder 3 (A). Hoechst 33342/ Propidiumiodid-Färbung nach 72-stündiger Behandlung mit 120 µg/ml hr-GAL1 oder 3. \*pos Ko vs neg Ko; \*\*\*p<0.001; n=12 aus 3 unabhängigen Experimenten. Vergrößerungsbalken: 75 µm, Blau: Hoechst-Zellkernfärbung

### 3.2.6 Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs durch hr-GAL1 und 3

$\beta$ -Catenin ist ein konstitutiv exprimiertes Protein, das sowohl beteiligt ist an Zell-Zellkontakten als auch als zentrales Signalmolekül des Wnt-Signalwegs fungiert. Die Aktivierung des Wnt/Frizzled-Rezeptors verhindert die Degradierung des  $\beta$ -Catenins, sodass dieses als Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren, die Bildung eines Proteinkomplexes initiieren und somit die Aktivierung bestimmter Zielgene bewirken kann. Da der retinale Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg unverzichtbar ist für die Gefäßentwicklung und Galektine diesen aktivieren können, (Ohlmann et al., 2010, Tian et al., 2017, Ose et al., 2012, Shimura et al., 2005) wurde untersucht, inwiefern exogenes Galektin-1 und -3 sein antiangiogenes Potential über die Hemmung des Wnt  $\beta$ -Catenin Signalwegs vermitteln könnte. Verglichen zu der unbehandelten Positivkontrolle wiesen beide hr-GAL-Gruppen einen signifikant erhöhten Quotienten von  $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -tubulin auf. In der Densitometrie zeigten sich die gemessenen  $\beta$ -Catenin Proteinlevel nach Behandlung mit hr-GAL1 und 3 bei  $2.7 \pm 0.9$  und  $2.7 \pm 0.7$  signifikant erhöht verglichen zu den Proteinleveln der unbehandelten HRMEC (Ko vs alle hr-GAL: \* $p < 0.5$ ). (Abbildung 14A)

Um die Translokation des  $\beta$ -Catenins in den Zellkern und hierdurch eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs näher zu betrachten, erfolgte eine immunologische Färbung. Nach Exposition der HRMEC gegenüber hr-GAL1 oder 3 wurde die Signalweg-Aktivität mittels immunfluoreszenter Markierung des  $\beta$ -Catenin untersucht. Bei unbehandelten Endothelzellen fand sich eine spezifische Färbung verstärkt an der Zellmembran sowie im Zytoplasma. Der Zellkern war dabei nur schwach angefärbt. Im Vergleich hierzu war die Färbung nach 24 Stunden Inkubation mit den hr-GAL1 und 3 verstärkt im Zellkern auszumachen, was daraufhin deutet, dass hr-GAL1 und 3 den Wnt/  $\beta$ -Catenin Signalweg aktiviert. (Abbildung 14B)

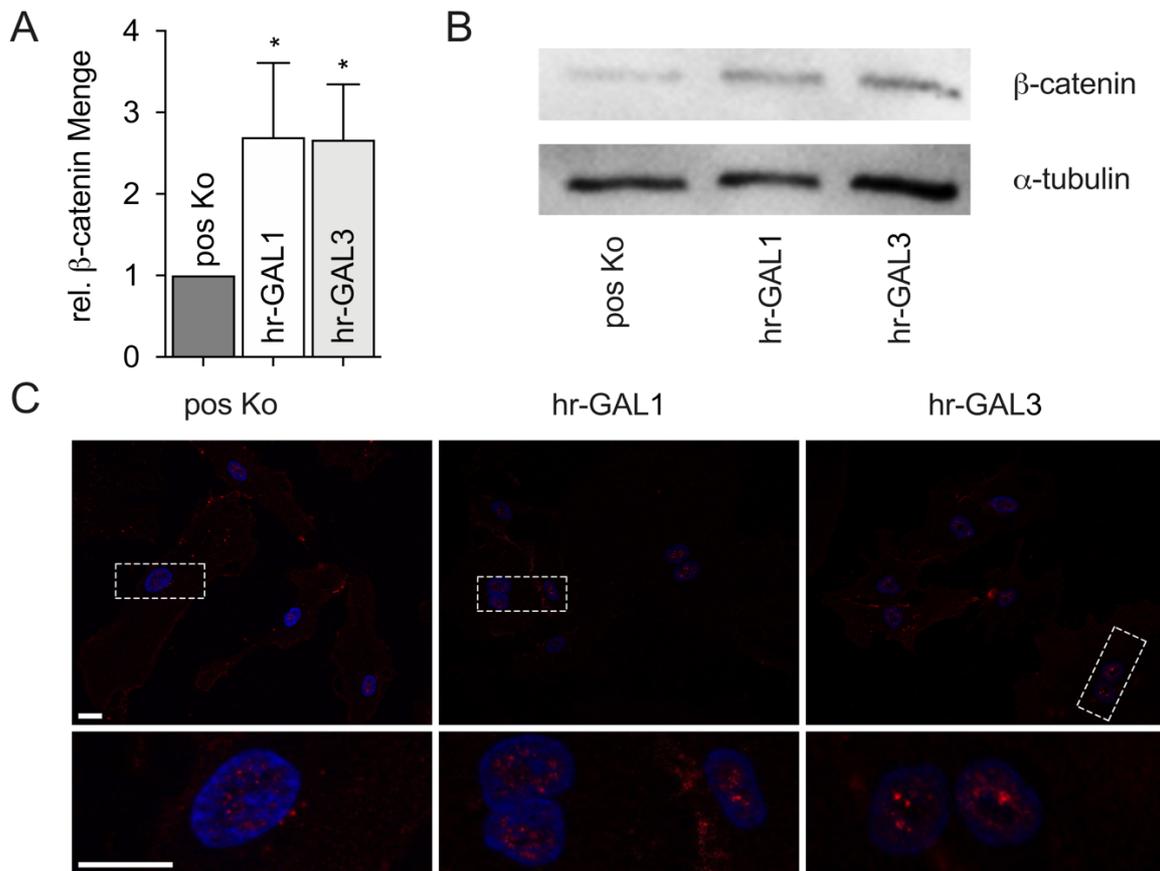


Abbildung 14: hr-GAL1 und 3 aktivieren den  $\beta$ -Catenin Signalweg in-vitro.

A., B. Western Blot Analyse (B) und Densitometrie (A) der relativen  $\beta$ -Catenin Spiegel in Relation zu  $\alpha$ -tubulin nach 24 Stunden Inkubation mit 120  $\mu$ g/ml hr-GAL1 und 3. (\*Ko vs alle hr-GAL:  $p=0.021$ ) \* $p<0.5$ ;  $n=3$  für 3 unabhängige Experimente

C. Immunfluoreszente Färbung des  $\beta$ -Catenin nach 24 Stunden Inkubation mit 120  $\mu$ g/ml hr-GAL1 oder 3. Vergrößerungsbalken: 20  $\mu$ m, Ausschnitte: 3x Vergrößerung verglichen zu dem Original; Blau: Hoechst-Zellkernfärbung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Inhibition der Angiogenesemechanismen durch hr-GAL1 und 3 *in-vitro*

Basierend auf den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass hr-GAL1 und 3 über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Fähigkeit besitzen, *in-vitro* inhibierend auf wachstumsfaktorstimulierte HRMEC zu wirken. So konnten wir feststellen, dass hohe hr-GAL1 und 3 Konzentrationen die Proliferation, Migration, Adhäsion und die Bildung kapillärer Strukturen reduzieren können. Die Inhibition der angiogenen Eigenschaften stellte sich dabei unabhängig möglicher toxischer Einflüsse ein. Gleichzeitig zeigte sich, dass für die Angiogenese essentiellen Signalwege wie der Wnt/ $\beta$ -Catenin Weg durch die hohen Dosen an hr-GAL1 und 3 nicht blockiert, sondern aktiviert werden.

#### 4.1.1 Diskussion der verwendeten Untersuchungsmethoden

In der retinalen Gefäßentwicklung, sowohl in der physiologischen wie der pathologischen, differenzieren sich die mikrovaskulären Endothelzellen der bereits vorhandenen Kapillaren für die Gefäßneubildung aus. (Potente et al., 2011) Ausgelöst durch Hypoxie-induzierte Wachstumsfaktoren die von ischämischen Netzhautarealen abgegeben werden, wandeln sie sich hierbei unter anderem zu Tipzellen. (Campochiaro, 2015) Angrenzende mikrovaskuläre Zellen proliferieren, schließen sich der Migration an und bilden mit den Tipzellen neue Gefäßstrukturen. (Potente et al., 2011) Um ein besseres Verständnis der pathologischen Gefäßneubildung zu bekommen, wurden verschiedene *in-vitro* Methoden entwickelt, die die *in-vivo* Situation widerspiegeln sollen. Anhand der hierfür häufig verwendeten mikrovaskulären Endothelzellen erhofft man sich Einblicke in die physiologischen und pathologischen angiogenen Eigenschaften dieser relevanten Zellen. (Ngo et al., 2014) Im folgendem sollen nun die Limitationen dieser *in-vitro* Modelle diskutiert werden und insbesondere darauf eingegangen werden, welche Übertragbarkeit auf die *in-vivo* Situation möglich ist.

Zu Beginn der Arbeit haben wir uns bewusst für die Nutzung humaner retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen für unser Krankheitsmodell entschieden, um die

bestmögliche Darstellung des Zielgewebes zu garantieren. Vaskuläre endotheliale Zellen anderer Gewebe und Spezies (Deissler et al., 2020) oder immortalisierte Zellen (Deissler et al., 2005) zeichnen sich durch ihre Heterogenität hinsichtlich des Zellverhaltens und der Zytogenetik sowie der Proteinexpression aus, da die Gefäße an anderen Orten des Körpers andere Aufgabenschwerpunkte besitzen und ihre Zellen daher weniger geeignet gewesen wären. (Lelkes et al., 1994, Bharadwaj et al., 2013) Da auch die Kultivierung in Zellkultur die zellulären Reaktionen verändern und eine Dedifferenzierung der Endothelzellen vor allem in den höheren Passagen zur Folge haben kann, wurden die humanen primären Zellen lediglich in ihren frühen Passagen verwendet. (Nisato et al., 2004) Das Ziel war es, die Probleme und systemischen Fehler der *in-vitro* Studien zu vermeiden und eine möglichst direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf einen *in-vivo* Kontext zu ermöglichen. (Naritomi et al., 2003) Um jedoch eine sichere Aussage zur klinischen Relevanz treffen zu können, sind nachfolgende *in-vivo* Studien weiterhin unerlässlich.

Das für die Versuche verwendete Zellkulturmedium wurde mit Wachstumsfaktoren und 2 % FKS versetzt und soll das pathologische, angiogenesefördernde Umfeld des Krankheitsmodells simulieren. Dies ist notwendig, um überhaupt ein *in-vitro* Gefäßwachstum zu erzeugen und wird daher in diesem Fall auch für die Beurteilung des antiangiogenen Effekts der Galektine genutzt. Die Reaktion der HRMEC auf Wachstumsfaktoren ist sehr mannigfaltig, (Abu El-Asrar et al., 2018) und es liegt nahe, dass die unbekanntes Zusammensetzung des FKS (van der Valk et al., 2018) (van der Valk et al., 2010) und die zugesetzten Wachstumsfaktoren nicht der genauen pathologischen Situation im Auge bei dem Auftreten von Neovaskularisationen entspricht. Das erschaffene Zellumfeld mit Monokultur kann die *in-vivo* Umgebung der retinalen Angiogenese zudem nur eingeschränkt widerspiegeln. (Carmeliet, 2000) Als Modell konnten die Versuche jedoch eindrücklich eine potenzielle Wirksamkeit der hr-GAL1 und 3 gegen neovaskuläre endotheliale Prozesse zeigen, sodass es sich lohnt, diese in Zukunft an anderen *in-vivo* und *in-vitro* Modellen zu bestätigen. Die Versuche hierzu sind geplant.

Diskussionsbedarf zeigt sich auch hinsichtlich der Herstellungsmethode der hr-GAL. Die hr-GAL1 und 3 werden genetisch rekombinant in *Escherichia coli*

nach der Transfektion mit Plasmiden in Bakterien hergestellt. (Priglinger et al., 2013) (Studier, 2005) Da es sich um Prokaryonten handelt und wichtige Zellorganellen wie der Golgiapparat und das Endoplasmatische Retikulum in Bakterien nicht vorhanden sind, (Brocchieri and Karlin, 2005) (Dell et al., 2010) kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die Proteine wie eukaryotische Proteine gefaltet sind. Allerdings gibt es Anhaltspunkte, dass Galektine auch in eukaryotischen Zellen nicht auf die Verarbeitung in intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum und den Golgiapparat angewiesen sind und zur Exozytose nicht verpackt werden müssen. (Popa et al., 2018) Auf Basis der Ergebnisse unserer Experimente lässt sich zusätzlich darauf schließen, dass es sich um die gewünschten funktionellen Proteine handelt. Einerseits wurde der pETM Plasmidvector, der zur Transfektion der Escherichia coli Bakterien diente, mit humaner DNA hergestellt, sodass zumindest auf Nukleinsäurebasis das richtige Protein vorliegt. (Priglinger et al., 2013) Andererseits wird die vermutlich regelrechte Faltung der Proteine durch ihre erhaltene Funktion indirekt bestätigt. Die nach der Synthese durch die Bakterien verwendete Chromatographiesäule zur Aufreinigung der Galektine enthielt als spezifische Bindedomäne die  $\beta$ -Lactose. Hier kann davon ausgegangen werden, dass die Proteine eine erhaltene Funktion für das Binden der  $\beta$ -Lactose-modifizierten Agarosebeads haben müssen. (Ochieng et al., 2002) In unseren Experimenten zeigte sich außerdem ein biologischer Effekt der hr-GAL1 und 3 auf die HRMEC, welcher ebenfalls eine spezifische Proteinfunktion nahelegt. Die hinzugegebenen hr-GAL1 und 3 waren gleich den zelleigenen, intrazellulären Galektinen immunologisch durch spezifische Antikörper anfärbbar. Nach Inkubation mit hr-GAL1 und 3 nahm die Fläche der fluoreszierenden Strukturen auf den Aufnahmen massiv zu, was ebenfalls ein indirekter Hinweis auf das Vorliegen eines wahrscheinlich regelrecht gefalteten Proteins ist.

Die Funktionalität der Proteine wird weiterhin durch die spezifische Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden nach Zugabe der hr-GAL1 und 3 unterstrichen. Zunächst zeigen die immunfluoreszenten Färbungen eine Bindung des hr-GAL1 und 3 an der Zellmembran. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen typischen Bindungsort der Galektine. (Obermann et al., 2017) Unabhängig hiervon konnte eine zeitgleiche Aktivierung des Wnt/Frizzled/ $\beta$ -

Catenin-Signalwegs sowohl durch fluoreszenzmikroskopische Experimente (kein Komma) als auch durch Western Blot Analyse gezeigt werden. Die immunologischen Färbungen sollen möglichst spezifisch und sensitiv einen visuellen Nachweis eines zu untersuchenden Antigens bieten und unspezifische Färbungen durch Blockierungen verhindert werden. (Kabiraj et al., 2015) Bei  $\beta$ -Catenin ist die Spezifität im Vergleich zu anderen Proteinen leichter zu beurteilen, da es im Rahmen der Signaltransduktion zu einer typischen Verlagerung des  $\beta$ -Catenins in den Zellkern kommt. (Seitz et al., 2010) Dies beobachteten wir auch in unseren Versuchen. Weiterhin konnte der Western Blot die ebenfalls für die Aktivierung spezifische Zunahme des  $\beta$ -Catenins nachweisen. (Cao et al., 2018) (Braunger et al., 2013) Beide Versuche bestätigen letztlich in der Zusammenschau eine spezifische Bindung der hr-GAL1 und 3 an die Zelle und die Auslösung bekannter Signalwege.

Die Hypothese, die Wirkung basiere hierbei auf toxischen Effekten der hr-GAL1 und 3 ist zunächst berechtigt. Besonders, da die hr-GAL1 und 3 im Vergleich zur Literatur in einer höheren Konzentration als normal hinzugegeben wurden. (Cao et al., 2018) Gegen einen toxischen Effekt sprechen jedoch zum einen die spezifische Aktivierung der oben beschriebenen Signalkaskaden. Zum anderen zeigen sich in unseren Versuchen weder eine erhöhte Apoptose noch eine erhöhte Nekrose. Dies wurde durch zwei unabhängige Versuche bestätigt und kann einen hr-GAL1 und 3 induzierten Zelltod widerlegen. *In-vivo* erscheint eine Nekrose und Apoptose von Endothelzellen zunächst sinnvoll, da die Ursprungszelle der Gefäßproliferationen abstirbt. (Segura et al., 2002b) Allerdings muss man annehmen und in Betracht ziehen, dass dann die hohen hr-GAL1 und 3 Konzentrationen die Gewebe- und Zellintegrität sowie die Homeostasis auch an anderen Orten destabilisieren. (Polverini, 1995, Nör and Polverini, 1999)

Die weiteren Versuche dienten in ihrer Kombination der Untersuchung der Wirkung von hr-GAL1 und 3 auf die verschiedenen Aspekte der angiogenen Eigenschaften der HRMEC. Da sich bei der Bildung neuer Gefäße die Endothelzellen teilen müssen, wurde zunächst die Zellproliferation untersucht. (Potente et al., 2011) Zuerst wurde ein BrdU-ELISA durchgeführt. Hier wird in der DNS Synthese Phase des Zellzyklus das BrdU von den Zellen in die eigene DNS

eingebaut und kann dann mittels spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. (Lehner et al., 2011) Die Zellteilung wird dabei jedoch nur indirekt abgeschätzt, da es nach der Synthesephase nicht fest zur Zellteilung (Mitose) kommen muss oder die Mitose durch BrdU sogar verstärkt werden kann. (Lehner et al., 2011) Die gewonnenen Daten wurden deshalb noch mittels WST-1-Assay bestätigt. Hier wird ebenfalls indirekt die Zellzahl anhand der metabolischen Zellaktivität bestimmt. (Peskin and Winterbourn, 2000a) Es zeigte sich nach 48 Stunden unter hr-GAL1 und 3 eine Reduktion der Zellzahl und die erhobenen Daten konnten so in der zweiten Analyse bestätigt werden. Wie oben beschrieben trat keine verfälschende erhöhte Nekrose oder Apoptose auf. Die Übertragung der Erkenntnisse auf *in-vivo* Situationen ist weiterhin nur bedingt möglich, es lässt sich aber hoffen, dass dieser wichtige pathogenetische Faktor auch dort gehemmt wird.

*In-vivo* muss, angeregt durch angiogene Chemokine und Wachstumsfaktoren, neben der Proliferation auch eine Zellmigration und Chemotaxis zur Gefäßneubildung stattfinden. Die Zellen migrieren im angeregten Zustand vom Ursprungsgefäßlumen weg, um neue Gefäße zu bilden. (Potente et al., 2011) Die Migration erwies sich, wie oben beschrieben, durch hr-GAL1 und 3 *in-vitro* reduziert. Die Wundinduzierte-Migrations Analyse zeigte eine qualitative Inhibierung der Migration mit einer verringerten wiederkolonialisierten Fläche über den Zeitraum der Inkubation unter Behandlung. Allerdings muss bedacht werden, dass bei diesem Versuch auch andere Faktoren gemessen werden, die unabhängig von der Migration einen Verschluss des Spalts ermöglichen. Diese sind zum Beispiel die Adhäsion und die Proliferation. (Coomber and Gotlieb, 1990) Zur Bestätigung, dass nur die Migration gemessen wurde, wurde in der Time-Lapse-Mikroskopie die Migrationsdistanz, Geschwindigkeit und Chemotaxisfähigkeit gemessen. Alle diese Faktoren zeigten sich ebenfalls reduziert. Diese Methode eignet sich vor allem für eine qualitative Analyse des Migrationsverhalten. Nachteilig ist hierbei eine potentielle Ergebnisverfälschung bei vergleichsweise kleiner Zellzahl und die fehlende Darstellung der Heterogenität an Einflussfaktoren auf die Migration. (Masuzzo et al., 2016, Aman and Piotrowski, 2010) Trotz methodischer Nachteile beider Verfahren kann in der Zusammenschau von einer Reduktion der Zellmigration ausgegangen werden. Soweit übertragbar, wäre *in-vivo* somit eine verlangsamte

Endothelzellmigrationsrate zu dem Ort der Hypoxie die Folge direkter hr-GAL1 oder 3 Zugabe. (Ariano et al., 2005)

Unter direktem Einfluss von hr-GAL1 oder 3 zeigte sich in unseren Experimenten die Adhäsionsfähigkeit der Endothelzellen vermindert. Die Ergebnisse stehen somit im Einklang zu Studien, die hohen exogenen Galektin-1 und 3 Konzentrationen einen Adhäsions-inhibierenden Effekt attestiert haben. (Ochieng et al., 1998) *In-Vivo* ist die Zelladhäsion wichtig für die Zellregulation und Kommunikation und spielt eine fundamentale Rolle für die Entwicklung und den Erhalt von Gewebestrukturen. (Huang and Ingber, 1999) Bei physiologischer wie pathologischer retinaler Angiogenese würde dieser Funktionsverlust der Adhäsion der Endothelzellen an die EZM sowie an angrenzende Zellen somit zu vermindertem vaskulärem Wachstum und Gefäßregression führen. (Bischoff, 1997, Strömblad and Cheresh, 1996) Die passive Adhäsion in Zellkultur basierend auf dem Anlagern, der Abflachung und der Ausbreitung des Zellkörpers konnte unter den hohen hr-GAL1 oder 3 Konzentrationen nicht regulär stattfinden. Die Zellen haben *in-vitro* allerdings erschwerte Bedingungen durch den Ersatz der EZM und der Nachbarzellen durch das unbehandelte Zellkulturplastik. (Khalili and Ahmad, 2015) (Priglinger et al., 2013)

Die Morphogenese der Endothelzellen zu kapillaren Strukturen mittels Ausbildung tubulärer Strukturen wurde in unseren *in-vitro* Versuchen gehemmt. Übernimmt man diese Beobachtung auf physiologische Gewebevorgänge, würde dies eine Reduktion der neovaskulären kapillären Netzbildung bedeuten. Das Gel, auf dem die Endothelzellen kultiviert werden, wird von Murine Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumorzellen der Maus als Basalmembran synthetisiert. (Kubota et al., 1988) Wichtige Bestandteile sind basalmembrantypische Proteine wie Laminin, Kollagen 4 und Fibrin, die die Zellen zu proangiogenem Verhalten stimulieren sollen. (Kanzawa et al., 1993) Vergleicht man den Versuchsaufbau mit der *in-vivo* Situation, fallen sofort die Einschränkungen auf. (Kleinman and Martin, 2005) Es handelt sich um eine zweidimensionale Kultivierung unter Nutzung einer Monokultur, während *in-vivo* weitere Zelltypen drei-dimensional an dem Gefäßaufbau beteiligt sind. Die Zusammensetzung der Gele, die von Tumorzellen der Maus in Zellkultur produziert werden, entspricht wahrscheinlich nicht den Bedingungen in der

Netzhaut. Unterschiedliche Zusammensetzungen der Gele im Vergleich zu der EZM *in-vivo* können die Ergebnisse verändern. Weiterhin ist zu debattieren, ob die in Matrixgel gebildeten tubulären Strukturen als Kapillaren gelten können, da das Vorhandensein eines Lumens nicht endgültig nachgewiesen wurde. (Segura et al., 2002a, Connolly et al., 2002, Bikfalvi et al., 1991)

Zusammenfassend gibt es modellbedingt in der Studie Limitationen, die bei der Beurteilung der Auswirkung der hr-GAL1 oder 3 zu beachten sind. *In-vitro* Modelle pathologischer retinaler Angiogenese stellen eine Vereinfachung der *in-vivo* Situation dar und erlauben eine gezielte Untersuchung einzelner Faktoren. (Vailhe et al., 2001) Dies gelang in dieser Studie hinsichtlich der Analyse der Reaktion retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen auf die Zugabe bestimmter Stoffe. (Adair and Montani, 2011) In diesem Zusammenhang fehlt die Zell- und Umgebungskomplexität der *in-vivo* Situation und stellt daher möglicherweise den Einfluss der Gewebe-Mikroumgebung auf die endotheliale Reaktion nicht angemessen dar. (Staton et al., 2009, Rezzola et al., 2014) Um die Effektivität und Wirkung potentieller therapeutischer Stoffe auf retinale Gefäßproliferation präklinisch abschließend beurteilen zu können, sind *in-vivo* Versuche notwendig. Dort lassen sich die pathologischen Prozesse besser darstellen und die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik ist näher an der klinischen Situation. (Auerbach et al., 2003, Slevin and McDowell, 2015) Die *in-vitro* Analyseverfahren können einzelne Schritte der Angiogenese aber sinnvoll imitieren und für eine valide, richtungsweisende Ersteinschätzung des isolierten, direkten Einflusses des zu untersuchenden inhibitorischen oder stimulierenden Wirkstoffes auf die Gefäßbildung genutzt werden ohne Störfaktoren berücksichtigen zu müssen. (Goodwin, 2007)

#### 4.1.2 Wirkung von endogenen und rekombinanten Galektinen

Unsere Daten legen nahe, dass höhere Konzentrationen von exogen hinzugefügtem hr-GAL1 oder 3 zu einer Hemmung angiogener zellulärer Verhaltensweisen an der Netzhaut führen. Eine vergleichbare Untersuchung zur Gefäßneubildung an der Netzhaut wurde nach unserem besten Wissen bisher nicht durchgeführt. Die Wirkung endogener Galektine auf die Angiogenese in und um die Netzhaut wurde hingegen auch in der Literatur untersucht, wobei endogene Galektine von dieser überwiegend als proangiogen beschrieben

werden. So wurde unter anderem gezeigt, dass endogene Galektine bei diabetischen fibrovaskulären Membranen in Zellkultur sowie *in-vivo* in Ratten proliferativ wirken können. Bei der diabetischen Retinopathie fanden sich erhöhte Konzentrationen der Lektine in Glaskörperproben. (Abu El-Asrar et al., 2020)(Kanda et al., 2020a) Bei Mäusen, bei denen eine sauerstoffinduzierte proliferative Retinopathie erzeugt wurde, ließ sich endogenes Galektin-1 verstärkt in der Nähe der Neovaskularisationen nachweisen. (Ridano et al., 2017) Auch intravitreale Injektionen von OTX008, einem selektiven niedermolekularen Inhibitor von Galektin-1, konnten retinale Neovaskularisationen bei Mäusen verringern. (Yang et al., 2017b) Zusammenfassend wurde dementsprechend eher ein proangiogener Effekt von endogenem Galektin gemessen.

Allerdings zeigen die rekombinanten, exogen hinzugefügten Galektine je nach verwendetem Model einen widersprüchlichen Einfluss auf unterschiedliche Krankheitsprozesse. Neben den Studien, die einen proangiogenen Effekt zeigen, (Cao et al., 2018) gibt es andere, die eher eine Hemmung der zellulären Verhaltensweisen in verschiedenen untersuchten Modellen darstellen. So wurde unter anderem ein inhibierender Effekt von rekombinantem Galektin-1 auf verschiedene Tumorzelllinien und Fibroblasten nachgewiesen (Adams et al., 1996) und mehrere Studien zeigten einen inhibitorischen Effekt von rekombinanten Galektinen auf retinale Pigmentepithelzellen bei der proliferativen Retinopathie. (Alge-Priglinger et al., 2009) (Priglinger et al., 2013) (Priglinger et al., 2016) (Alge et al., 2006) (Alge-Priglinger et al., 2009) Frühere Untersuchungen zu hohen Mengen an exogenem Galektin-1 und -3 zeigen eine antiproliferative Wirkung auf Endothelzellen, Fibroblasten, HEP 2 Karzinomzellen, U2 OS Osteosarkomazellen und neurogene Vorläuferzellen.(Thijssen et al., 2010, Adams et al., 1996, Sakaguchi et al., 2006) Dabei kann eine Abhängigkeit von der Mikroumgebung des Gewebes unterschiedliches Verhalten der unter Einfluss von Galektinen stehenden Zellen auslösen. (Griffioen and Thijssen, 2014) Die Konzentration der Galektine könnte ebenfalls eine Rolle spielen, da sie in unserem Fall im Vergleich zu Literatur eher höher gewählt war. (Griffioen and Thijssen, 2014) Diese Untersuchungen unterstützen somit die Beobachtungen unserer Versuche und bekräftigen die These einer potenziellen antiangiogenen Fähigkeit der rekombinanten Lektine. Die potenzielle Erklärung, dass der antiangiogene Effekt der hr-GAL1 und 3 auf

der Toxizität der rekombinanten Proteine basiert, konnte mittels des Zelltoddetektions-ELISA und der Hoechst/Propidium Iodid Fluoreszenzfärbung widerlegt werden.

#### 4.2 Stimulation angiogener Signalwege

Galektin-1 und -3 üben ihre gefäßbildende Wirkung zumindest teilweise über die verstärkte Aktivierung proangiogener Signalwege wie Wnt/ $\beta$ -catenin, (Shimura et al., 2005) Jagged-1/Notch, (Dos Santos et al., 2017) VEGF oder FGF-2 aus. (Eguchi and Wakabayashi, 2020) Die Aktivierung des transmembranären Wnt/Frizzled Rezeptors führt zu einer Inhibition des  $\beta$ -Catenin Abbaus. Dieses akkumuliert und aktiviert intranukleär die Transkription angiogener Zielgene. (Dejana, 2010) Innerhalb der beginnenden Phase der Angiogenese ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg aktiviert und Zielgene werden verstärkt exprimiert. (Dos Santos et al., 2017, Shimura et al., 2005, Markowska et al., 2010) Die Aktivierung seiner Rezeptoren ist essenziell für die Proliferation, Migration sowie Stabilisierung und Funktionserhaltung innerhalb der physiologischen und pathologischen Angiogenese. (Ye et al., 2009) Hier einzuordnen sind unsere Erkenntnisse, dass der proangiogene Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg durch die hr-GAL1 und 3 Behandlung *in-vitro* angeregt wird, obwohl hr-GAL1 und 3 die gefäßformierenden Eigenschaften der Wachstumsfaktoren und des FKS in HRMEC insgesamt reduzieren. Für Galektin-3 ist sowohl ein inhibitorischer wie auch aktivierender Effekt auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg bekannt. (Al-Dalahmah et al., 2020) Der potenzielle Mechanismus, der in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist die Aktivierung des AKT-Signalwegs. Dieser wiederum kann den  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex inhibieren und hierdurch die zytosolische sowie nukleäre Konzentration an  $\beta$ -Catenin, dem zentralen Mediatormolekül, erhöhen. (Bacigalupo et al., 2015, Song et al., 2009) Die Aktivierung des AKT-Signalwegs erfolgt durch Tyrosinkinase Rezeptoren, weshalb die Schlussfolgerung nahe liegt, dass Galektin-1 und-3 ihre Wirkung über diesen Mechanismus regulieren. Der inhibitorische Effekt sowie die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs weisen jedoch darauf hin, dass exogenes hr-GAL1 und 3 anregend, nicht supprimierend auf angiogene Signalwege in mikrovaskulären Endothelzellen wirken. Insgesamt scheint die Attenuierung der angiogenen Signalwege eher nicht ursächlich zu sein für die

inhibitorische Wirkung von Galektin-1 und -3 auf die proangiogenen Eigenschaften von HRMEC *in vitro*.

#### 4.3 Wirkunsabhängigkeit von der Galektinlokalisierung

Galektine finden sich nicht nur extrazellulär, sondern lassen sich auch in intrazellulären Kompartimenten und dem Nukleus nachweisen. Hierüber können sie diverse zelluläre und nukleäre Vorgänge wie Apoptose und Proliferation modifizieren.(Califice et al., 2004, Hafsia et al., 2020, Shih et al., 2019, Sciacchitano et al., 2018) Interessanterweise zeigt sich in Untersuchungen zu physiologischen Entwicklungen eine Veränderung der Hauptlokalisierung der Galektine im Verlauf der zellulären Entwicklung. So befand sich Galektin-1 während der mammären myofibroblastischen und glandulären Zellreifung vor allem intrazellulär. Nach vollständiger Ausdifferenzierung war es demgegenüber größtenteils an der Plasmamembran und der EZM nachweisbar.(Cooper and Barondes, 1990, Bhat et al., 2016) Die extrazelluläre Bindung des Galektin-1 an das Epithel der mammären Drüsen kann zu einer gleichzeitigen Abgabe des intrazellulär vorhandenen Galektins führen.(Bhat et al., 2016) Im Vergleich zeigten sich in unseren Versuchen, dass sich nach der Inkubation mit hr-GAL1 und 3 das intrazellulär vorhandene Galektin-1 und -3 in HRMEC reduziert. Dass die extrazelluläre Bindung der Galektine an Glykoproteine ihren intrazellulären Spiegel und hierbei auch ihre intrazelluläre Funktion reduzieren, wurde als potenzieller Rückkopplungsmechanismus postuliert. (Johannes et al., 2018) Unabhängig hiervon lagert sich vermehrt extrazellulär Galektin entlang der Plasmamembran und auf dem Zellkulturplastik ab. Die starke Färbung des Bereichs zwischen den Zellen basiert vermutlich auf der Sedimentierung der hr-GAL1 und 3 im Zellkulturmedium nach 24 Stunden. Fehlendes intrazelluläres endogenes Galektin ließe sich, unter Zuhilfenahme der oben genannten Studie, durch zusätzliche Exozytose des Proteins aus der Zelle erklären. (Banfer et al., 2018) Die Wirkung des hr-GAL1 und 3 auf die HRMEC wäre in diesem Fall zurückführbar auf:

- (1). den Verlust des intrazellulären Galektins, mit verminderter Signalwegaktivierung
- (2). auf die vermehrte extrazelluläre Anreicherung mit veränderter Wirkbeziehung auf Interaktionspartner im Extrazellulärraum.

Es ist zu (1). zu diskutieren, ob der Verlust des intrazellulär und nukleär vorhandenen Galektins über den Verlust des Proliferationsstimulus den antiangiogenen Effekt herbeiführt, da physiologisches endogenes Galektin Mitose-fördernd wirkt. Dies wurde bereits anderweitig beschrieben. In einem Mausmodell für experimentelle Orchitis erwies sich der Mangel an Galektin-1 als reduzierend für Krankheitsauftritt und Schwere. Fehlendes Galektin-1 durch ein mangelndes Lgals-1Gen wirkte hierbei ähnlich der exogenen Zugabe des rekombinanten Lektins. (Perez et al., 2015) Studien, die über einen gefäßstimulierenden Einfluss von Galektin-1 und -3 berichten, basieren meist auf Galektin-defizienten Mäusen oder dem Knockdown im RNA-Gen Gal in den mikrovaskulären Zellen und somit dem Mangel an endogenem, intrazellulärem Lektin.(Markowska et al., 2010, Thijssen et al., 2006) Mausmodelle, die der Untersuchung retinaler und choroidaler Gefäßproliferation dienen, zeigten bei endogenem Galektinmangel ebenfalls weniger Gefäßproliferationen und einen Erhalt der Blut-Retina Schranke.(Ridano et al., 2017, Yang et al., 2017a, Canning et al., 2007, Wu et al., 2019) Es kann somit vermutet werden, dass nicht nur der extrazelluläre Verlust von Galektin-1 und -3, sondern auch ein intrazellulärer Mangel zu den beobachteten hemmenden Effekten in den Galektinverlustmodellen beiträgt.

Zu (2). ist zu erwähnen, dass eine wichtige Grundfunktion der Zelle für die Entwicklung kapillarer Strukturen, ihrer Adhäsion und Migration ihre Interaktion mit der EZM ist.(Markowska et al., 2010) Für Galektin-1 und -3 zeigte sich, dass eine Veränderung der Umgebung, das heißt die Zusammensetzung der EZM, der Signalmoleküle und des Gewebes bei den einzelnen Zelltypen, ausschlaggebend ist für die Reaktion, die auf Aktivierung durch Galektin folgt. Ursächlich sind hierfür die direkten Wechselbeziehungen zwischen den Lektinen, der EZM und den Zellrezeptoren, die sich je nach Umgebungskondition in anderen Kombinationen darstellen.(Tsai et al., 2018, Hughes, 2001) Man kann annehmen, dass die hohen Dosen an hr-GAL1 und 3 ihre hemmende Wirkung über die Bindungen mit extrazellulären Rezeptoren und der Matrix modulieren. Die Interaktionspartner reagieren auf die plötzlichen, hohen Konzentrationen an exogenem, rekombinanten Galektin anders als sie dies bei den physiologischen, endogenen Konzentrationen würden. Der inhibierende, extrazellulär-aktivierte Einfluss der hr-GAL1 und 3 auf die Entwicklung kapillarer Strukturen, der

Adhäsion und der Migration, stünde somit im Gegensatz zu ihrer intrazellulär proangiogenen Aktivierung der Signalwege durch die Lektine. Unterstützend zu meiner Arbeit zeigen sich hier bei gegensätzlichen Auswirkungen der Galektine in den Studien homologe Ergebnisse. Ein Mangel an intrazellulärem endogenen Galektin führte ebenso wie die Zugabe von exogenem rekombinanten Galektin zu einer Inhibition der Gefäßproliferation. Die gegensätzliche Beobachtung, dass exogenes rekombinantes hr-GAL1 und 3 *in-vitro* auf die Gefäßbildung ebenfalls hemmend wirkt, wäre somit kein direkter Widerspruch.

## Zusammenfassung

Retinale Erkrankungen mit Neovaskulogenese stellen eine der Hauptursachen für Visusreduktion und -verlust in der westlichen Welt dar. Die pathophysiologische Reaktion auf retinale Ischämien und veränderte funktionelle und metabolische Bedürfnisse der Netzhaut zeigt sich als ungerichtete und unkontrollierte Gefäßneubildung aus kapillären Plexi, die zu Instabilität, Flüssigkeitsaustritt, Blutungen, Fibrose und Erkrankungsprogression neigt.

Galektin-1 und -3 sind  $\beta$ -Galaktosid bindende Lektine, die einen fundamentalen Einfluss auf angiogenes-treibende retinale Pathologien besitzen. Aktuelle Studien unterstellen den Galektinen hier einen regulativen Effekt auf Prozesse wie Proliferation, Inflammation, oxidativen Stress und vaskuläre Hyperpermeabilität. Während geringe physiologische Konzentrationen eher pro-angiogen zu wirken scheinen, ergeben sich in hohen Konzentrationen inhibitorische Effekt auf retinale Pigmentepithelzellen und somit die Implikation eines möglichen therapeutischer Einsatzes bei retinaler Neovaskulogenese.

Unsere *in-vitro* Studie zeigte nun eine signifikante Reduktion der angiogenen Eigenschaften humaner retinaler microvaskulärer Endothelzellen nach Behandlung mit hohen Konzentrationen an exogenem rekombinatem Galektin-1 und -3 in den Proliferations-, Migrations-, Viabilitäts-, Adhärenz-, Kapillarformations- und Apoptose-Assays. Die Bestimmung der zellulären Lektinlokalisierung sowie Produktion und Aktivierung der  $\beta$ -catenin Expression erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot Analysen und zeigte interessanterweise neben der Aktivierung des proangiogenen Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweges eine Reduktion des intrazellulären und endogenen Galektins.

Die Implikation einer antiangiogenen Wirkung hoher Konzentrationen an Galektin-1 und -3 steht hierbei in Kontrast zu ihren bekannten proangiogenen Fähigkeiten bei physiologischen Konzentrationen. Der regulative Effekt lässt sich jedoch argumentieren durch die vorbekannten gegensätzlichen Wirkmechanismen, welche abhängig von den zellulären und immunologischen Umgebungsvoraussetzungen variieren. Eine Runterregulation des intrazellulären endogenen proangiogenen Galektins bei gegensätzlicher antiangiogenen

Funktion des extrazellulären rekombinanten Lektins führt so womöglich zu den hier beleuchteten homologen Ergebnissen der Neovaskularisationsinhibition. Exogenes rekombinantes humanes Galektin-1 und -3 zeigt somit das Potential, in hohen Konzentrationen die angiogenen Eigenschaften der HRMEC *in vitro* zu inhibieren. Klinisch würde dies eine aussichtsreiche neue Therapieoption bei neovaskulären retinalen Pathologien bedeuten.

## Literatur

1984. An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol*, 102, 1130-4.
2008. 1 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. *Retina*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
2016. In Vitro Cell Models for Ophthalmic Drug Development Applications. *BioResearch Open Access*, 5, 94-108.
- ABSHER, M. 1973. CHAPTER 1 - Hemocytometer Counting. In: KRUSE, P. F. & PATTERSON, M. K. (eds.) *Tissue Culture*. Academic Press.
- ABU EL-ASRAR, A. M., AHMAD, A., ALAM, K., BITTOUN, E., SIDDIQUEI, M. M., MOHAMMAD, G., MOUSA, A., DE HERTOUGH, G. & OPDENAKKER, G. 2018. Association of 150-kDa oxygen-regulated protein with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*, 96, e460-e467.
- ABU EL-ASRAR, A. M., AHMAD, A., ALLEGAERT, E., SIDDIQUEI, M. M., ALAM, K., GIKANDI, P. W., DE HERTOUGH, G. & OPDENAKKER, G. 2020. Galectin-1 studies in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*, 98, e1-e12.
- ADAIR, T. H., GAY, W. J. & MONTANI, J. P. 1990. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol*, 259, R393-404.
- ADAIR, T. H. & MONTANI, J.-P. 2011. *Angiogenesis*, [San Rafael, CA], Morgan & Claypool Life Sciences.
- ADAMIS, A. P. & BERMAN, A. J. 2008. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol*, 30, 65-84.
- ADAMS, L., SCOTT, G. K. & WEINBERG, C. S. 1996. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta*, 1312, 137-44.
- AL-DALAHMAH, O., NICHOLSON, J., DRAIJER, S., SOARES, L. C. & SZELE, F. G. 2020. Galectin-3 diminishes Wnt signaling in the postnatal subventricular zone. *Stem Cells*, 38, 1149-1158.
- ALGE, C. S., PRIGLINGER, S. G., KOOK, D., SCHMID, H., HARITOGLOU, C., WELGELUSSEN, U. & KAMPIK, A. 2006. Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 415-26.
- ALGE-PRIGLINGER, C. S., ANDRE, S., KREUTZER, T. C., DEEG, C. A., KAMPIK, A., KERNT, M., SCHOFFL, H., PRIGLINGER, S. G. & GABIUS, H. J. 2009. Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by the human lectin galectin-1. *Mol Vis*, 15, 2162-73.
- ALIZADEH, E., MAMMADZADA, P. & ANDRE, H. 2018. The Different Facades of Retinal and Choroidal Endothelial Cells in Response to Hypoxia. *Int J Mol Sci*, 19.
- ALTMAN, F. P. 1976. Tetrazolium Salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9, III-51.
- AMAN, A. & PIOTROWSKI, T. 2010. Cell migration during morphogenesis. *Developmental Biology*, 341, 20-33.
- ANAND-APTE, B. & HOLLYFIELD, J. 2010. Developmental anatomy of the retinal and choroidal vasculature.
- ARDEN, G. B. & SIVAPRASAD, S. 2011. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*, 7, 291-304.
- ARIANO, P., DISTASI, C., GILARDINO, A., ZAMBURLIN, P. & FERRARO, M. 2005. A simple method to study cellular migration. *J Neurosci Methods*, 141, 271-6.

- ARNAOUTOVA, I., GEORGE, J., KLEINMAN, H. K. & BENTON, G. 2009. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 12, 267-274.
- AUERBACH, R., LEWIS, R., SHINNERS, B., KUBAI, L. & AKHTAR, N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*, 49, 32-40.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., CONRAD, A., ENGELE, J. & KIRSCH, J. 2014. *Duale Reihe Anatomie*, Thieme.
- BACIGALUPO, M. L., MANZI, M., ESPELT, M. V., GENTILINI, L. D., COMPAGNO, D., LADERACH, D. J., WOLFENSTEIN-TODEL, C., RABINOVICH, G. A. & TRONCOSO, M. F. 2015. Galectin-1 triggers epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Physiol*, 230, 1298-309.
- BANFER, S., SCHNEIDER, D., DEWES, J., STRAUSS, M. T., FREIBERT, S. A., HEIMERL, T., MAIER, U. G., ELSASSER, H. P., JUNGSMANN, R. & JACOB, R. 2018. Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E4396-E4405.
- BARGAGNA-MOHAN, P., RAVINDRANATH, P. P. & MOHAN, R. 2006. Small molecule anti-angiogenic probes of the ubiquitin proteasome pathway: potential application to choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 4138-45.
- BERGER, A. R., CRUESS, A. F., ALTOMARE, F., CHAUDHARY, V., COLLEAUX, K., GREVE, M., KHERANI, A., MANDELCORN, E. D., PARSONS, H., RHÉAUME, M. A. & TOURVILLE, E. 2015. Optimal Treatment of Retinal Vein Occlusion: Canadian Expert Consensus. *Ophthalmologica*, 234, 6-25.
- BHARADWAJ, A. S., APPUKUTTAN, B., WILMARTH, P. A., PAN, Y., STEMPEL, A. J., CHIPPS, T. J., BENEDETTI, E. E., ZAMORA, D. O., CHOI, D., DAVID, L. L. & SMITH, J. R. 2013. Role of the retinal vascular endothelial cell in ocular disease. *Prog Retin Eye Res*, 32, 102-80.
- BHAT, R., BELARDI, B., MORI, H., KUO, P., TAM, A., HINES, W. C., LE, Q. T., BERTOZZI, C. R. & BISSELL, M. J. 2016. Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E4820-7.
- BIESEMEIER, A., TAUBITZ, T., JULIEN, S., YOERUEK, E. & SCHRAERMAYER, U. 2014. Choriocapillaris breakdown precedes retinal degeneration in age-related macular degeneration. *Neurobiology of Aging*, 35, 2562-2573.
- BIKFALVI, A., CRAMER, E. M., TENZA, D. & TOBELEM, G. 1991. Phenotypic modulations of human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts using two angiogenic assays. *Biol Cell*, 72, 275-8.
- BISCHOFF, J. 1997. Cell adhesion and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 99, 373-376.
- BIZZARRO, M. J., HUSSAIN, N., JONSSON, B., FENG, R., MENT, L. R., GRUEN, J. R., ZHANG, H. & BHANDARI, V. 2006. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity. *Pediatrics*, 118, 1858-63.
- BOWLING, B., BURK, R. & TÖNJES, S. 2017. *Kanski's Klinische Ophthalmologie: Eins systematischer Ansatz*, Elsevier Health Sciences.
- BOYD, S. R., ZACHARY, I., CHAKRAVARTHY, U., ALLEN, G. J., WISDOM, G. B., CREE, I. A., MARTIN, J. F. & HYKIN, P. G. 2002. Correlation of Increased Vascular Endothelial Growth Factor With Neovascularization and Permeability in Ischemic Central Vein Occlusion. *Archives of Ophthalmology*, 120, 1644-1650.

- BRAUNGER, B. M., OHLMANN, A., KOCH, M., TANIMOTO, N., VOLZ, C., YANG, Y., BOSL, M. R., CVEKL, A., JAGLE, H., SEELIGER, M. W. & TAMM, E. R. 2013. Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/beta-catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. *Neurobiol Dis*, 50, 1-12.
- BROCCHIERI, L. & KARLIN, S. 2005. Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic Acids Res*, 33, 3390-400.
- BROWNING, A. C., DUA, H. S. & AMOAKU, W. M. 2008. The effects of growth factors on the proliferation and in vitro angiogenesis of human macular inner choroidal endothelial cells. *Br J Ophthalmol*, 92, 1003-8.
- CALIFICE, S., CASTRONOVO, V., BRACKE, M. & VAN DEN BRULE, F. 2004. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*, 23, 7527-36.
- CAMPA, C., ALIVERNINI, G., BOLLETTA, E., PARODI, M. B. & PERRI, P. 2016. Anti-VEGF Therapy for Retinal Vein Occlusions. *Curr Drug Targets*, 17, 328-36.
- CAMPBELL, J. P., ZHANG, M., HWANG, T. S., BAILEY, S. T., WILSON, D. J., JIA, Y. & HUANG, D. 2017. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Scientific Reports*, 7, 42201.
- CAMPOCHIARO, P. A. 2013. Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl)*, 91, 311-21.
- CAMPOCHIARO, P. A. 2015. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*, 49, 67-81.
- CANNING, P., GLENN, J. V., HSU, D. K., LIU, F. T., GARDINER, T. A. & STITT, A. W. 2007. Inhibition of advanced glycation and absence of galectin-3 prevent blood-retinal barrier dysfunction during short-term diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2007, 51837.
- CAO, Z., HAO, Z., XIN, M., YU, L., WANG, L., ZHANG, Y., ZHANG, X. & GUO, X. 2018. Endogenous and exogenous galectin-3 promote the adhesion of tumor cells with low expression of MUC1 to HUVECs through upregulation of N-cadherin and CD44. *Lab Invest*, 98, 1642-1656.
- CARLSON, B. M. 2019. Chapter 7 - Special Senses—Vision and Hearing. In: CARLSON, B. M. (ed.) *The Human Body*. Academic Press.
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6, 389-95.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298-307.
- CHEN, L., YAO, Y., SUN, L., ZHOU, J., LIU, J., WANG, J., LI, J. & TANG, J. 2015. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*, 8, 78.
- CHEN, Q. & MA, J. X. 2017. Canonical Wnt signaling in diabetic retinopathy. *Vision Res*, 139, 47-58.
- CHEN, W. S., CAO, Z., LEFFLER, H., NILSSON, U. J. & PANJWANI, N. 2017. Galectin-3 Inhibition by a Small-Molecule Inhibitor Reduces Both Pathological Corneal Neovascularization and Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58, 9-20.
- CHEN, Y., HU, Y., ZHOU, T., ZHOU, K. K., MOTT, R., WU, M., BOULTON, M., LYONS, T. J., GAO, G. & MA, J. X. 2009. Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models. *Am J Pathol*, 175, 2676-85.
- CHOU, F. C., CHEN, H. Y., KUO, C. C. & SYTWU, H. K. 2018. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 19.

- CONNOLLY, J. O., SIMPSON, N., HEWLETT, L. & HALL, A. 2002. Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol Biol Cell*, 13, 2474-85.
- COOMBER, B. L. & GOTLIEB, A. I. 1990. In vitro endothelial wound repair. Interaction of cell migration and proliferation. *Arteriosclerosis*, 10, 215-22.
- COOPER, D. N. & BARONDES, S. H. 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*, 110, 1681-91.
- COUSIN, J. M. & CLONINGER, M. J. 2016. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci*, 17.
- CRAWFORD, T. N., ALFARO, D. V., 3RD, KERRISON, J. B. & JABLON, E. P. 2009. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev*, 5, 8-13.
- CROCI, D. O., CERLIANI, J. P., DALOTTO-MORENO, T., MENDEZ-HUERGO, S. P., MASCANFRONI, I. D., DERGAN-DYLON, S., TOSCANO, M. A., CARAMELO, J. J., GARCIA-VALLEJO, J. J., OUYANG, J., MESRI, E. A., JUNTILLA, M. R., BAIS, C., SHIPP, M. A., SALATINO, M. & RABINOVICH, G. A. 2014. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell*, 156, 744-58.
- CUMMINGS, R. D., LIU, F. T. & VASTA, G. R. 2015. Galectins. In: RD, VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., STANLEY, P., HART, G. W., AEBI, M., DARVILL, A. G., KINOSHITA, T., PACKER, N. H., PRESTEGARD, J. H., SCHNAAR, R. L. & SEEBERGER, P. H. (eds.) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY).
- CUYPERS, M. H., KASANARDJO, J. S. & POLAK, B. C. 2000. Retinal blood flow changes in diabetic retinopathy measured with the Heidelberg scanning laser Doppler flowmeter. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238, 935-41.
- DARLAND, D. C., MASSINGHAM, L. J., SMITH, S. R., PIEK, E., SAINT-GENIEZ, M. & D'AMORE, P. A. 2003. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol*, 264, 275-88.
- DAVIDSON, P. J., LI, S. Y., LOHSE, A. G., VANDERGAAST, R., VERDE, E., PEARSON, A., PATTERSON, R. J., WANG, J. L. & ARNOYS, E. J. 2006. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology*, 16, 602-11.
- DE IONGH, R. U., ABUD, H. E. & HIME, G. R. 2006. WNT/Frizzled signaling in eye development and disease. *Front Biosci*, 11, 2442-64.
- DEISSLER, H., DEISSLER, H., LANG, G. K. & LANG, G. E. 2005. Generation and characterization of iBREC: novel hTERT-immortalized bovine retinal endothelial cells. *Int J Mol Med*, 16, 65-70.
- DEISSLER, H. L., STUTZER, J. N., LANG, G. K., GRISANTI, S., LANG, G. E. & RANJBAR, M. 2020. VEGF receptor 2 inhibitor nintedanib completely reverts VEGF-A165-induced disturbances of barriers formed by retinal endothelial cells or long-term cultivated ARPE-19 cells. *Exp Eye Res*, 194, 108004.
- DEJANA, E. 2010. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res*, 107, 943-52.
- DELL, A., GALADARI, A., SASTRE, F. & HITCHEN, P. 2010. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol*, 2010, 148178.
- DORRELL, M., UUSITALO-JARVINEN, H., AGUILAR, E. & FRIEDLANDER, M. 2007. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol*, 52 Suppl 1, S3-19.

- DOS SANTOS, S. N., SHELDON, H., PEREIRA, J. X., PALUCH, C., BRIDGES, E. M., EL-CHEIKH, M. C., HARRIS, A. L. & BERNARDES, E. S. 2017. Galectin-3 acts as an angiogenic switch to induce tumor angiogenesis via Jagged-1/Notch activation. *Oncotarget*, 8, 49484-49501.
- DRENSER, K. A. 2016. Wnt signaling pathway in retinal vascularization. *Eye and brain*, 8, 141-146.
- DUH, E. J., SUN, J. K. & STITT, A. W. 2017. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI insight*, 2, e93751.
- EGUCHI, R. & WAKABAYASHI, I. 2020. HDGF enhances VEGFdependent angiogenesis and FGF2 is a VEGFIndependent angiogenic factor in nonsmall cell lung cancer. *Oncol Rep*, 44, 14-28.
- ELDWEIK, L. & MANTAGOS, I. S. 2016. Role of VEGF Inhibition in the Treatment of Retinopathy of Prematurity. *Seminars in Ophthalmology*, 31, 163-168.
- FORRESTER, J. V., DICK, A. D., MCMENAMIN, P. G., ROBERTS, F. & PEARLMAN, E. 2016. Chapter 1 - Anatomy of the eye and orbit. In: FORRESTER, J. V., DICK, A. D., MCMENAMIN, P. G., ROBERTS, F. & PEARLMAN, E. (eds.) *The Eye (Fourth Edition)*. W.B. Saunders.
- FUJII, A., SHEARER, T. R. & AZUMA, M. 2015. Galectin-3 enhances extracellular matrix associations and wound healing in monkey corneal epithelium. *Exp Eye Res*, 137, 71-8.
- GENET, G., BOYE, K., MATHIVET, T., OLA, R., ZHANG, F., DUBRAC, A., LI, J., GENET, N., HENRIQUE GERALDO, L., BENEDETTI, L., KUNZEL, S., PIBOUIN-FRAGNER, L., THOMAS, J. L. & EICHMANN, A. 2019. Endophilin-A2 dependent VEGFR2 endocytosis promotes sprouting angiogenesis. *Nat Commun*, 10, 2350.
- GHOSH, S. & COLLIER, A. 2012. Section 5 - Chronic complications. In: GHOSH, S. & COLLIER, A. (eds.) *Churchill's Pocketbook of Diabetes (Second Edition) (Second Edition)*. Oxford: Churchill Livingstone.
- GOODWIN, A. M. 2007. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research*, 74, 172-183.
- GRANT, M. B. & LUTTY, G. A. 2013. Chapter 18 - Retinal and Choroidal Vasculature: Retinal Oxygenation. In: RYAN, S. J., SADDA, S. R., HINTON, D. R., SCHACHAT, A. P., SADDA, S. R., WILKINSON, C. P., WIEDEMANN, P. & SCHACHAT, A. P. (eds.) *Retina (Fifth Edition)*. London: W.B. Saunders.
- GREGG, R. G., MCCALL, M. A. & MASSEY, S. C. 2013. Chapter 15 - Function and Anatomy of the Mammalian Retina. In: RYAN, S. J., SADDA, S. R., HINTON, D. R., SCHACHAT, A. P., SADDA, S. R., WILKINSON, C. P., WIEDEMANN, P. & SCHACHAT, A. P. (eds.) *Retina (Fifth Edition)*. London: W.B. Saunders.
- GREHN, F. 2009. *Augenheilkunde*, Springer Berlin Heidelberg.
- GRIFFIOEN, A. W. & THIJSSSEN, V. L. 2014. Galectins in tumor angiogenesis. *Ann Transl Med*, 2, 90.
- GUPTA, M. P., HERZLICH, A. A., SAUER, T. & CHAN, C. C. 2016. Retinal Anatomy and Pathology. *Dev Ophthalmol*, 55, 7-17.
- HAFSIA, N., FORIEN, M., RENAUDIN, F., DELACOUR, D., REBOUL, P., VAN LENT, P., COHEN-SOLAL, M., LIOTE, F., POIRIER, F. & EA, H. K. 2020. Galectin 3 Deficiency Alters Chondrocyte Primary Cilium Formation and Exacerbates Cartilage Destruction via Mitochondrial Apoptosis. *Int J Mol Sci*, 21.
- HALL, A. P. 2006. Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy. *Toxicol Pathol*, 34, 763-75.

- HAMMES, H.-P. 2005. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Hormone and metabolic research*, 37, 39-43.
- HANSEN, E. D. & HARTNETT, M. E. 2019. A review of treatment for retinopathy of prematurity. *Expert Rev Ophthalmol*, 14, 73-87.
- HAUDEK, K. C., VOSS, P. G., LOCASCIO, L. E., WANG, J. L. & PATTERSON, R. J. 2009. A mechanism for incorporation of galectin-3 into the spliceosome through its association with U1 snRNP. *Biochemistry*, 48, 7705-12.
- HE, X. W., LI, W. L., LI, C., LIU, P., SHEN, Y. G., ZHU, M. & JIN, X. P. 2017. Serum levels of galectin-1, galectin-3, and galectin-9 are associated with large artery atherosclerotic stroke. *Sci Rep*, 7, 40994.
- HENKIND, P. 1967. Radial peripapillary capillaries of the retina. I. Anatomy: human and comparative. *The British journal of ophthalmology*, 51, 115.
- HENKIND, P. & WISE, G. N. 1974. Retinal neovascularization, collaterals, and vascular shunts. *Br J Ophthalmol*, 58, 413-22.
- HILLENMAYER, A., WERTHEIMER, C. M., GEERLOF, A., EIBL, K. H., PRIGLINGER, S., PRIGLINGER, C. & OHLMANN, A. 2022. Galectin-1 and -3 in high amounts inhibit angiogenic properties of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *PLoS One*, 17, e0265805.
- HOLLYFIELD, J. G., BONILHA, V. L., RAYBORN, M. E., YANG, X., SHADRACH, K. G., LU, L., UFRET, R. L., SALOMON, R. G. & PEREZ, V. L. 2008. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature Medicine*, 14, 194-198.
- HUANG, S. & INGBER, D. E. 1999. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol*, 1, E131-8.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol*, 160, 106-54.
- HUGHES, R. C. 2001. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, 83, 667-76.
- HUGHES, S., YANG, H. & CHAN-LING, T. 2000. Vascularization of the Human Fetal Retina: Roles of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1217-1228.
- ISHIDA, S., USUI, T., YAMASHIRO, K., KAJI, Y., AMANO, S., OGURA, Y., HIDA, T., OGUCHI, Y., AMBATI, J., MILLER, J. W., GRAGLOUDAS, E. S., NG, Y. S., D'AMORE, P. A., SHIMA, D. T. & ADAMIS, A. P. 2003. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med*, 198, 483-9.
- IURISCI, I., TINARI, N., NATOLI, C., ANGELUCCI, D., CIANCHETTI, E. & IACOBELLI, S. 2000. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 6, 1389-93.
- JO, D. H., KIM, J. H. & KIM, J. H. 2010. How to overcome retinal neuropathy: the fight against angiogenesis-related blindness. *Arch Pharm Res*, 33, 1557-65.
- JOHANNES, L., JACOB, R. & LEFFLER, H. 2018. Galectins at a glance. *J Cell Sci*, 131.
- JUNG, J. J., TIWARI, A., INAMDAR, S. M., THOMAS, C. P., GOEL, A. & CHOUDHURY, A. 2012. Secretion of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR1/sFlt1) requires Arf1, Arf6, and Rab11 GTPases. *PLoS One*, 7, e44572.
- KABIRAJ, A., GUPTA, J., KHAITAN, T. & BHATTACHARYA, P. T. Principle and techniques of immunohistochemistry a review. 2015.
- KANDA, A., HIROSE, I., NODA, K., MURATA, M. & ISHIDA, S. 2020a. Glucocorticoid-transactivated TSC22D3 attenuates hypoxia- and diabetes-induced Muller glial

- galectin-1 expression via HIF-1 $\alpha$  destabilization. *J Cell Mol Med*, 24, 4589-4599.
- KANDA, A., HIROSE, I., NODA, K., MURATA, M. & ISHIDA, S. 2020b. Glucocorticoid-transactivated TSC22D3 attenuates hypoxia- and diabetes-induced Müller glial galectin-1 expression via HIF-1 $\alpha$  destabilization. *J Cell Mol Med*, 24, 4589-4599.
- KANG, Q. & YANG, C. 2020. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol*, 37, 101799.
- KANZAWA, S., ENDO, H. & SHIOYA, N. 1993. Improved in vitro angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Ann Plast Surg*, 30, 244-51.
- KARLSSON, A., CHRISTENSON, K., MATLAK, M., BJÖRSTAD, Å., BROWN, K. L., TELEMO, E., SALOMONSSON, E., LEFFLER, H. & BYLUND, J. 2008. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology*, 19, 16-20.
- KASSUMEH, S. A., WERTHEIMER, C. M., VON STUDNITZ, A., HILLENMAYER, A., PRIGLINGER, C., WOLF, A., MAYER, W. J., TEUPSER, D., HOLDT, L. M., PRIGLINGER, S. G. & EIBL-LINDNER, K. H. 2018. Poly(lactic-co-glycolic) Acid as a Slow-Release Drug-Carrying Matrix for Methotrexate Coated onto Intraocular Lenses to Conquer Posterior Capsule Opacification. *Curr Eye Res*, 43, 702-708.
- KAUR, C., FOULDS, W. S. & LING, E. A. 2008. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res*, 27, 622-47.
- KELLNER, U. & WACHTLIN, J. 2008. *Retina: Diagnostik und Therapie von Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*, Georg Thieme Verlag.
- KHALILI, A. A. & AHMAD, M. R. 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International journal of molecular sciences*, 16, 18149-18184.
- KLAASSEN, I., VAN NOORDEN, C. J. & SCHLINGEMANN, R. O. 2013. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res*, 34, 19-48.
- KLEINMAN, H. K. & MARTIN, G. R. 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15, 378-86.
- KOHNER, E. M. & HENKIND, P. 1970. Correlation of fluorescein angiogram and retinal digest in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 69, 403-14.
- KOHNO, R., HATA, Y., MOCHIZUKI, Y., ARITA, R., KAWAHARA, S., KITA, T., MIYAZAKI, M., HISATOMI, T., IKEDA, Y., AIELLO, L. P. & ISHIBASHI, T. 2010. Histopathology of neovascular tissue from eyes with proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab injection. *Am J Ophthalmol*, 150, 223-229.e1.
- KRIEGLSTEIN, G. K., JONESCU-CUYPERS, C. P. & SEVERIN, M. 1999. Aderhaut. *Atlas der Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- KUBOTA, Y., KLEINMAN, H. K., MARTIN, G. R. & LAWLEY, T. J. 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 107, 1589-98.
- KUR, J., NEWMAN, E. A. & CHAN-LING, T. 2012. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 31, 377-406.
- LAAF, D., BOJAROVA, P., ELLING, L. & KREN, V. 2018. Galectin-Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends Biotechnol*.

- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAOURI, M., CHEN, E., LOOMAN, M. & GALLAGHER, M. 2011. The burden of disease of retinal vein occlusion: review of the literature. *Eye (Lond)*, 25, 981-8.
- LAVIA, C., MECÊ, P., NASSISI, M., BONNIN, S., MARIE-LOUISE, J., COUTURIER, A., ERGINAY, A., TADAYONI, R. & GAUDRIC, A. 2020. Retinal Capillary Plexus Pattern and Density from Fovea to Periphery Measured in Healthy Eyes with Swept-Source Optical Coherence Tomography Angiography. *Scientific reports*, 10, 1474-1474.
- LEHNER, B., SANDNER, B., MARSCHALLINGER, J., LEHNER, C., FURTNER, T., COUILLARD-DESPRES, S., RIVERA, F. J., BROCKHOFF, G., BAUER, H. C., WEIDNER, N. & AIGNER, L. 2011. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res*, 345, 313-28.
- LELKES, P. I., MANOLOPOULOS, V. G., CHICK, D. & UNSWORTH, B. R. 1994. Endothelial Cell Heterogeneity and Organ — Specificity. In: MARAGOUDAKIS, M. E., GULLINO, P. M. & LELKES, P. I. (eds.) *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects*. Boston, MA: Springer US.
- LIANG, C.-C., PARK, A. Y. & GUAN, J.-L. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2, 329.
- LIEBNER, S., CORADA, M., BANGSOW, T., BABBAGE, J., TADDEI, A., CZUPALLA, C. J., REIS, M., FELICI, A., WOLBURG, H., FRUTTIGER, M., TAKETO, M. M., VON MELCHNER, H., PLATE, K. H., GERHARDT, H. & DEJANA, E. 2008. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *Journal of Cell Biology*, 183, 409-417.
- LINDER, S. 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology*, 17, 107-117.
- LOGAN, C. Y. & NUSSE, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- LUIS, J., EASTLAKE, K., KHAW, P. T. & LIMB, G. A. 2020. Galectins and their involvement in ocular disease and development. *Experimental Eye Research*, 197, 108120.
- MAHMOOD, T. & YANG, P.-C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4, 429-434.
- MARKOWSKA, A. I., LIU, F. T. & PANJWANI, N. 2010. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med*, 207, 1981-93.
- MARTOWICZ, A., TRUSOHAMN, M., JENSEN, N., WISNIEWSKA-KRUK, J., CORADA, M., NING, F. C., KELE, J., DEJANA, E. & NYQVIST, D. 2019. Endothelial beta-Catenin Signaling Supports Postnatal Brain and Retinal Angiogenesis by Promoting Sprouting, Tip Cell Formation, and VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) 2 Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39, 2273-2288.
- MASLAND, R. H. 2012a. The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76, 266-80.
- MASLAND, R. H. 2012b. The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76, 266-280.
- MASUZZO, P., VAN TROYS, M., AMPE, C. & MARTENS, L. 2016. Taking Aim at Moving Targets in Computational Cell Migration. *Trends Cell Biol*, 26, 88-110.
- MELLO-BOSNIC, C., GIMENES, A. D., OLIANI, S. M. & GIL, C. D. 2018. Treatment with galectin-1 eye drops regulates mast cell degranulation and attenuates the severity of conjunctivitis. *Eur J Pharmacol*, 833, 124-130.

- MENDEZ-HUERGO, S. P., BLIDNER, A. G. & RABINOVICH, G. A. 2017. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Curr Opin Immunol*, 45, 8-15.
- MENDONCA, H. R., CARPI-SANTOS, R., DA COSTA CALAZA, K. & BLANCO MARTINEZ, A. M. 2020. Neuroinflammation and oxidative stress act in concert to promote neurodegeneration in the diabetic retina and optic nerve: galectin-3 participation. *Neural Regen Res*, 15, 625-635.
- MUTLU, F. M. & SARICI, S. U. 2013. Treatment of retinopathy of prematurity: a review of conventional and promising new therapeutic options. *Int J Ophthalmol*, 6, 228-36.
- NAKAHARA, S., OKA, N., WANG, Y., HOGAN, V., INOHARA, H. & RAZ, A. 2006. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer Res*, 66, 9995-10006.
- NARITOMI, Y., TERASHITA, S., KAGAYAMA, A. & SUGIYAMA, Y. 2003. Utility of hepatocytes in predicting drug metabolism: comparison of hepatic intrinsic clearance in rats and humans in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos*, 31, 580-8.
- NETWORK, W. C. F. T. D. R. C. R. 2015. Panretinal Photocoagulation vs Intravitreal Ranibizumab for Proliferative Diabetic Retinopathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 314, 2137-2146.
- NGO, T., NAGAMORI, E., SHIMIZU, T., OKANO, T., TAYA, M. & KINO-OKA, M. 2014. In Vitro Models for Angiogenesis Research: A Review. *International Journal of Tissue Regeneration*, 5, 37-45.
- NIO-KOBAYASHI, J. 2017. Tissue- and cell-specific localization of galectins,  $\beta$ -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int*, 92, 25-36.
- NISATO, R. E., HARRISON, J. A., BUSER, R., ORCI, L., RINSCH, C., MONTESANO, R., DUPRAZ, P. & PEPPER, M. S. 2004. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span. *Am J Pathol*, 165, 11-24.
- NÖR, J. E. & POLVERINI, P. J. 1999. Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis. *Angiogenesis*, 3, 101-116.
- NUSSE, R. & CLEVERS, H. 2017. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169, 985-999.
- OBERMANN, J., PRIGLINGER, C. S., MERL-PHAM, J., GEERLOF, A., PRIGLINGER, S., GOTZ, M. & HAUCK, S. M. 2017. Proteome-wide Identification of Glycosylation-dependent Interactors of Galectin-1 and Galectin-3 on Mesenchymal Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells. *Mol Cell Proteomics*, 16, 1528-1546.
- OCHIENG, J., FURTAK, V. & LUKYANOV, P. 2002. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*, 19, 527-35.
- OCHIENG, J., LEITE-BROWNING, M. L. & WARFIELD, P. 1998. Regulation of Cellular Adhesion to Extracellular Matrix Proteins by Galectin-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246, 788-791.
- OHLMANN, A., SEITZ, R., BRAUNGER, B., SEITZ, D., BOSL, M. R. & TAMM, E. R. 2010. Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *J Neurosci*, 30, 183-93.
- OSE, R., OHARAA, O. & NAGASE, T. 2012. Galectin-1 and Galectin-3 Mediate Protocadherin-24-Dependent Membrane Localization of beta-catenin in Colon Cancer Cell Line HCT116. *Curr Chem Genomics*, 6, 18-26.

- OZERDEM, U. & STALLCUP, W. B. 2003. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*, 6, 241-9.
- PARODI, M. B. & BANDELLO, F. 2009. Branch retinal vein occlusion: classification and treatment. *Ophthalmologica*, 223, 298-305.
- PATERNOTTE, E., GAUCHER, C., LABRUDE, P., STOLTZ, J. F. & MENU, P. 2008. Review: behaviour of endothelial cells faced with hypoxia. *Biomed Mater Eng*, 18, 295-9.
- PATTERSON, R. J., HAUDEK, K. C., VOSS, P. G. & WANG, J. L. 2015. Examination of the role of galectins in pre-mRNA splicing. *Methods Mol Biol*, 1207, 431-49.
- PEREZ, C. V., GOMEZ, L. G., GUALDONI, G. S., LUSTIG, L., RABINOVICH, G. A. & GUAZZONE, V. A. 2015. Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. *Sci Rep*, 5, 12259.
- PERONE, M. J., BERTERA, S., SHUFESKY, W. J., DIVITO, S. J., MONTECALVO, A., MATHERS, A. R., LARREGINA, A. T., PANG, M., SETH, N., WUCHERPFENNIG, K. W., TRUCCO, M., BAUM, L. G. & MORELLI, A. E. 2009. Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol*, 182, 2641-53.
- PERRY, P. & WOLFF, S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156.
- PESKIN, A. V. & WINTERBOURN, C. C. 2000a. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta*, 293, 157-66.
- PESKIN, A. V. & WINTERBOURN, C. C. 2000b. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica chimica acta*, 293, 157-166.
- PHNG, L.-K., POTENTE, M., LESLIE, J. D., BABBAGE, J., NYQVIST, D., LOBOV, I., ONDR, J. K., RAO, S., LANG, R. A., THURSTON, G. & GERHARDT, H. 2009. Nrarp Coordinates Endothelial Notch and Wnt Signaling to Control Vessel Density in Angiogenesis. *Developmental Cell*, 16, 70-82.
- POLVERINI, P. J. 1995. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6, 230-47.
- POPA, S. J., STEWART, S. E. & MOREAU, K. 2018. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol*, 83, 42-50.
- POTENTE, M., GERHARDT, H. & CARMELIET, P. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146, 873-87.
- POURNARAS, C. J., RUNGGER-BRANDLE, E., RIVA, C. E., HARDARSON, S. H. & STEFANSSON, E. 2008. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 27, 284-330.
- PRIGLINGER, C. S., OBERMANN, J., SZOBER, C. M., MERL-PHAM, J., OHMAYER, U., BEHLER, J., GRUHN, F., KREUTZER, T. C., WERTHEIMER, C., GEERLOF, A., PRIGLINGER, S. G. & HAUCK, S. M. 2016. Epithelial-to-Mesenchymal Transition of RPE Cells In Vitro Confers Increased beta1,6-N-Glycosylation and Increased Susceptibility to Galectin-3 Binding. *PLoS One*, 11, e0146887.
- PRIGLINGER, C. S., SZOBER, C. M., PRIGLINGER, S. G., MERL, J., EULER, K. N., KERNT, M., GONDI, G., BEHLER, J., GEERLOF, A., KAMPIK, A., UEFFING, M. & HAUCK, S. M. 2013. Galectin-3 induces clustering of CD147 and integrin-beta1 transmembrane glycoprotein receptors on the RPE cell surface. *PLoS One*, 8, e70011.
- PROKOFYEVA, E. & ZRENNER, E. 2012. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: a literature review. *Ophthalmic Res*, 47, 171-88.

- PURNYN, H. 2013. The Mammalian Retina: Structure and Blood Supply. *Neurophysiology*, 45, 266-276.
- QUIMSON, S. K. 2015. Retinopathy of Prematurity: Pathogenesis and Current Treatment Options. *Neonatal Netw*, 34, 284-7.
- RAMÍREZ, J. M., TRIVIÑO, A., RAMÍREZ, A. I. & SALAZAR, J. J. 1998. Organization and Function of Astrocytes in Human Retina. In: CASTELLANO, B., GONZÁLEZ, B. & NIETO-SAMPEDRO, M. (eds.) *Understanding Glial Cells*. Boston, MA: Springer US.
- REICHENBACH, A. & BRINGMANN, A. 2020. Glia of the human retina. *Glia*, 68, 768-796.
- REMYINGTON, L. A. 2012. Chapter 4 - Retina. In: REMINGTON, L. A. (ed.) *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)*. Saint Louis: Butterworth-Heinemann.
- REZZOLA, S., BELLERI, M., GARIANO, G., RIBATTI, D., COSTAGLIOLA, C., SEMERARO, F. & PRESTA, M. 2014. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 17, 429-42.
- RICCI, F., BANDELLO, F., NAVARRA, P., STAURENGHI, G., STUMPP, M. & ZARBIN, M. 2020. Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Therapeutic Management and New-Upcoming Approaches. *Int J Mol Sci*, 21.
- RIDANO, M. E., SUBIRADA, P. V., PAZ, M. C., LORENC, V. E., STUPIRSKI, J. C., GRAMAJO, A. L., LUNA, J. D., CROCI, D. O., RABINOVICH, G. A. & SANCHEZ, M. C. 2017. Galectin-1 expression imprints a neurovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF. *Oncotarget*, 8, 32505-32522.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-4.
- RODRÍGUEZ, M. L., PÉREZ, S., MENA-MOLLÁ, S., DESCO, M. C. & ORTEGA Á, L. 2019. Oxidative Stress and Microvascular Alterations in Diabetic Retinopathy: Future Therapies. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 4940825.
- ROMERO-AROCA, P., REYES-TORRES, J., BAGET-BERNALDIZ, M. & BLASCO-SUNE, C. 2014. Laser treatment for diabetic macular edema in the 21st century. *Curr Diabetes Rev*, 10, 100-12.
- RUNKLE, E. A. & ANTONETTI, D. A. 2011. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol*, 686, 133-48.
- SAKAGUCHI, M., SHINGO, T., SHIMAZAKI, T., OKANO, H. J., SHIWA, M., ISHIBASHI, S., OGURO, H., NINOMIYA, M., KADOYA, T., HORIE, H., SHIBUYA, A., MIZUSAWA, H., POIRIER, F., NAKAUCHI, H., SAWAMOTO, K. & OKANO, H. 2006. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7112-7.
- SAWADA, O., KAWAMURA, H., KAKINOKI, M., SAWADA, T. & OHJI, M. 2007. Vascular endothelial growth factor in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 125, 1363-6.
- SCIACCHITANO, S., LAVRA, L., MORGANTE, A., ULIVIERI, A., MAGI, F., DE FRANCESCO, G. P., BELLOTTI, C., SALEHI, L. B. & RICCI, A. 2018. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci*, 19.
- SCOTT, A., POWNER, M. B., GANDHI, P., CLARKIN, C., GUTMANN, D. H., JOHNSON, R. S., FERRARA, N. & FRUTTIGER, M. 2010. Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature. *PLoS one*, 5, e11863-e11863.

- SEELENMEYER, C., WEGEHINGEL, S., TEWS, I., KUNZLER, M., AEBI, M. & NICKEL, W. 2005. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J Cell Biol*, 171, 373-81.
- SEGURA, I., SERRANO, A., DE BUITRAGO, G. G., GONZÁLEZ, M. A., ABAD, J. L., CLAVERÍA, C., GÓMEZ, L., BERNAD, A., MARTÍNEZ, A. C. & RIESE, H. H. 2002a. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *Faseb j*, 16, 833-41.
- SEGURA, I., SERRANO, A., GONZÁLEZ DE BUITRAGO, G., GONZÁLEZ, M. A., ABAD, J. L., CLAVERÍA, C., GÓMEZ, L., BERNAD, A., MARTÍNEZ-A, C. & RIESE, H. H. 2002b. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *The FASEB Journal*, 16, 833-841.
- SEITZ, R., HACKL, S., SEIBUCHNER, T., TAMM, E. R. & OHLMANN, A. 2010. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J Neurosci*, 30, 5998-6010.
- SELVAM, S., KUMAR, T. & FRUTTIGER, M. 2018. Retinal vasculature development in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 63, 1-19.
- SHAH, P. K., PRABHU, V., KARANDIKAR, S. S., RANJAN, R., NARENDRAN, V. & KALPANA, N. 2016. Retinopathy of prematurity: Past, present and future. *World J Clin Pediatr*, 5, 35-46.
- SHAO, Y., CHEN, J., FREEMAN, W., DONG, L. J., ZHANG, Z. H., XU, M., QIU, F., DU, Y., LIU, J., LI, X. R. & MA, J. X. 2019. Canonical Wnt Signaling Promotes Neovascularization Through Determination of Endothelial Progenitor Cell Fate via Metabolic Profile Regulation. *Stem Cells*, 37, 1331-1343.
- SHIH, T. C., FAN, Y., KISS, S., LI, X., DENG, X. N., LIU, R., CHEN, X. J., CARNEY, R., CHEN, A., GHOSH, P. M. & LAM, K. S. 2019. Galectin-1 inhibition induces cell apoptosis through dual suppression of CXCR4 and Ras pathways in human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol*, 21, 1389-1400.
- SHIMURA, T., TAKENAKA, Y., FUKUMORI, T., TSUTSUMI, S., OKADA, K., HOGAN, V., KIKUCHI, A., KUWANO, H. & RAZ, A. 2005. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res*, 65, 3535-7.
- SIVAKUMAR, V., FOULDS, W. S., LUU, C. D., LING, E. A. & KAUR, C. 2011. Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *J Pathol*, 224, 245-60.
- SLEVIN, M. & MCDOWELL, G. 2015. *Handbook of Vascular Biology Techniques*, Springer Netherlands.
- SMITH, B. J. 1984. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: WALKER, J. M. (ed.) *Proteins*. Totowa, NJ: Humana Press.
- SONG, S., MAZUREK, N., LIU, C., SUN, Y., DING, Q. Q., LIU, K., HUNG, M. C. & BRESALIER, R. S. 2009. Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3beta activity. *Cancer Res*, 69, 1343-9.
- SPOONER, K., FRASER-BELL, S., HONG, T. & CHANG, A. A. 2019. Five-year outcomes of retinal vein occlusion treated with vascular endothelial growth factor inhibitors. *BMJ Open Ophthalmol*, 4, e000249.
- STATON, C. A., REED, M. W. R. & BROWN, N. J. 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology*, 90, 195-221.

- STEFANSSON, E. 2001. The therapeutic effects of retinal laser treatment and vitrectomy. A theory based on oxygen and vascular physiology. *Acta Ophthalmol Scand*, 79, 435-40.
- STITT, A. W., HUGHES, S. J., CANNING, P., LYNCH, O., COX, O., FRIZZELL, N., THORPE, S. R., COTTER, T. G., CURTIS, T. M. & GARDINER, T. A. 2004. Substrates modified by advanced glycation end-products cause dysfunction and death in retinal pericytes by reducing survival signals mediated by platelet-derived growth factor. *Diabetologia*, 47, 1735-46.
- STRAUSS, O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85, 845-81.
- STRIGLIA, E., CACCIOPPO, A., CASTELLINO, N., REIBALDI, M. & PORTA, M. 2020. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drugs*, 25, 261-271.
- STRÖMBLAD, S. & CHERESH, D. A. 1996. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol*, 6, 462-8.
- STUDIER, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 41, 207-34.
- SU, D. & HUBSCHMAN, J.-P. 2017. A Review of Subthreshold Micropulse Laser and Recent Advances in Retinal Laser Technology. *Ophthalmology and therapy*, 6, 1-6.
- SUGIYAMA, T., GOTO, K. & KANO, Y. 1976. Mechanism of differential Giemsa method for sister chromatids. *Nature*, 259, 59-60.
- SUN, Y. & SMITH, L. E. H. 2018. Retinal Vasculature in Development and Diseases. *Annual review of vision science*, 4, 101-122.
- THIJSSSEN, V. L., BARKAN, B., SHOJI, H., ARIES, I. M., MATHIEU, V., DELTOUR, L., HACKENG, T. M., KISS, R., KLOOG, Y., POIRIER, F. & GRIFFIOEN, A. W. 2010. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res*, 70, 6216-24.
- THIJSSSEN, V. L., POSTEL, R., BRANDWIJK, R. J., DINGS, R. P., NESMELOVA, I., SATIJN, S., VERHOFSTAD, N., NAKABEPPU, Y., BAUM, L. G., BAKKERS, J., MAYO, K. H., POIRIER, F. & GRIFFIOEN, A. W. 2006. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 15975-80.
- THOMAS, L. & PASQUINI, L. A. 2019. Galectin-3 Exerts a Pro-differentiating and Pro-myelinating Effect Within a Temporal Window Spanning Precursors and Pre-oligodendrocytes: Insights into the Mechanisms of Action. *Mol Neurobiol*.
- THUMANN, G., DOU, G., WANG, Y. & HINTON, D. R. 2013. Chapter 16 - Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. In: RYAN, S. J., SADDA, S. R., HINTON, D. R., SCHACHAT, A. P., SADDA, S. R., WILKINSON, C. P., WIEDEMANN, P. & SCHACHAT, A. P. (eds.) *Retina (Fifth Edition)*. London: W.B. Saunders.
- TIAN, L., CHEN, K., CAO, J., HAN, Z., WANG, Y., GAO, L., FAN, Y. & WANG, C. 2017. Galectin3 induces the phenotype transformation of human vascular smooth muscle cells via the canonical Wnt signaling. *Mol Med Rep*, 15, 3840-3846.
- TOLENTINO, M. S., TOLENTINO, A. J. & TOLENTINO, M. J. 2016. Current and investigational drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 25, 1011-1022.
- TOSCANO, M. A., COMMODARO, A. G., ILARREGUI, J. M., BIANCO, G. A., LIBERMAN, A., SERRA, H. M., HIRABAYASHI, J., RIZZO, L. V. & RABINOVICH, G. A. 2006. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant

- Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol*, 176, 6323-32.
- TSAI, M. S., CHIANG, M. T., TSAI, D. L., YANG, C. W., HOU, H. S., LI, Y. R., CHANG, P. C., LIN, H. H., CHEN, H. Y., HWANG, I. S., WEI, P. K., HSU, C. P., LIN, K. I., LIU, F. T. & CHAU, L. Y. 2018. Galectin-1 Restricts Vascular Smooth Muscle Cell Motility Via Modulating Adhesion Force and Focal Adhesion Dynamics. *Sci Rep*, 8, 11497.
- VADLAPATLA, R. K., VADLAPUDI, A. D. & MITRA, A. K. 2013. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases. *Curr Drug Targets*, 14, 919-35.
- VAILHE, B., VITTET, D. & FEIGE, J. J. 2001. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*, 81, 439-52.
- VAN DER VALK, J., BIEBACK, K., BUTA, C., COCHRANE, B., DIRKS, W. G., FU, J., HICKMAN, J. J., HOHENSEE, C., KOLAR, R., LIEBSCH, M., PISTOLLATO, F., SCHULZ, M., THIEME, D., WEBER, T., WIEST, J., WINKLER, S. & GSTRAUNTHALER, G. 2018. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*, 35, 99-118.
- VAN DER VALK, J., BRUNNER, D., DE SMET, K., FEX SVENNINGSEN, A., HONEGGER, P., KNUDSEN, L. E., LINDL, T., NORABERG, J., PRICE, A., SCARINO, M. L. & GSTRAUNTHALER, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*, 24, 1053-63.
- VAS, V., FAJKA-BOJA, R., ION, G., DUDICS, V., MONOSTORI, E. & UHER, F. 2005. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells*, 23, 279-87.
- VECINO, E., RODRIGUEZ, F. D., RUZAFI, N., PEREIRO, X. & SHARMA, S. C. 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 1-40.
- VIRGILI, G., PARRAVANO, M., EVANS, J. R., GORDON, I. & LUCENTEFORTE, E. 2018. Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD007419.
- VOGT, D., VIELMUTH, F., WERTHEIMER, C., HAGENAU, F., GUENTHER, S. R., WOLF, A., SPINDLER, V., PRIGLINGER, S. G. & SCHUMANN, R. G. 2018. Premacular membranes in tissue culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 256, 1589-1597.
- WANG, Z., LIU, C. H., HUANG, S. & CHEN, J. 2019. Wnt Signaling in vascular eye diseases. *Prog Retin Eye Res*, 70, 110-133.
- WERTHEIMER, C., LIEGL, R., KERNT, M., DOCHEVA, D., KAMPIK, A. & EIBL-LINDNER, K. H. 2014. EGFR-blockade with erlotinib reduces EGF and TGF-beta2 expression and the actin-cytoskeleton which influences different aspects of cellular migration in lens epithelial cells. *Curr Eye Res*, 39, 1000-12.
- WEST, H., RICHARDSON, W. D. & FRUTTIGER, M. 2005. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development*, 132, 1855-1862.
- WONG, W. L., SU, X., LI, X., CHEUNG, C. M., KLEIN, R., CHENG, C. Y. & WONG, T. Y. 2014. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 2, e106-16.
- WU, D., KANDA, A., LIU, Y., KASE, S., NODA, K. & ISHIDA, S. 2019. Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J*, 33, 2498-2513.

- WU, W. C., DRENSER, K., TRESE, M., CAPONE, A., JR. & DAILEY, W. 2007. Retinal phenotype-genotype correlation of pediatric patients expressing mutations in the Norrie disease gene. *Arch Ophthalmol*, 125, 225-30.
- YAMAMOTO, T., KANDA, A., KASE, S. & ISHIDA, S. 2021. Hypoxia Induces Galectin-1 Expression Via Autoinduction of Placental Growth Factor in Retinal Pigment Epithelium Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 62, 22.
- YANG, N., ZHANG, W., HE, T. & XING, Y. 2017a. Silencing of galectin-1 inhibits retinal neovascularization and ameliorates retinal hypoxia in a murine model of oxygen-induced ischemic retinopathy. *Exp Eye Res*, 159, 1-15.
- YANG, N., ZHANG, W., HE, T. & XING, Y. 2017b. Suppression of Retinal Neovascularization by Inhibition of Galectin-1 in a Murine Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *J Ophthalmol*, 2017, 5053035.
- YE, X., WANG, Y., CAHILL, H., YU, M., BADEA, T. C., SMALLWOOD, P. M., PEACHEY, N. S. & NATHANS, J. 2009. Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell*, 139, 285-98.
- ZANON CDE, F., SONEHARA, N. M., GIROL, A. P., GIL, C. D. & OLIANI, S. M. 2015. Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation. *Mol Vis*, 21, 1036-50.
- ZHANG, C., TANNOUS, E. & ZHENG, J. J. 2019. Oxidative stress upregulates Wnt signaling in human retinal microvascular endothelial cells through activation of disheveled. *J Cell Biochem*, 120, 14044-14054.
- ZHAO, Y. & SINGH, R. P. 2018. The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy. *Drugs in context*, 7, 212532-212532.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich in jedweder Art bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Die Arbeit war mit Höhen und Tiefen verbunden und ich hatte das große Glück, viele Menschen in meinem professionellen wie privaten Umfeld zu haben, die mich von Anfang an geleitet und meine Ideen mit mir mitverfolgt haben und ein Ohr für meine Fragen und Sorgen hatten. Sie alle haben mich mit produktiven Gesprächen unterstützt und mein Projekt durch ihre Mithilfe beeinflusst.

Besonderer Dank gilt unserem Laborleiter und meinem Betreuer, PD Dr. Andreas Ohlmann für die ausgezeichnete Betreuung, die Bereitstellung seiner Zeit, Geduld, Expertise und fachliche Hilfe im Lauf des gesamten Projektes, im Rahmen der experimentellen Versuche, der Publikation und den Kongressvorstellungen.

Auch meiner Doktormutter, Prof. Kirsten Eibl-Lindner, danke ich von Herzen für meine Einführung in die Forschungsgruppe und das wissenschaftliche Arbeiten, für die fachliche Unterstützung und Leitung, die Führung meines Projektes sowie die Durchsicht meiner Arbeit.

Besonders -meist liebevoll ermunternd und unermüdlich- unterstützt und begleitet hat mich Christian Wertheimer. Ich konnte mich immer Rat und Hilfe suchend an ihn wenden und eine reflektierte, erfahrene und durchdachte Antwort erhalten.

Ich danke Frau PD Dr. Claudia Priglinger und Herrn Prof. Dr. Siegfried Priglinger für die Etablierung der Projektthematik innerhalb unserer Forschungsgruppe, für die Erlaubnis, an diesem Projekt arbeiten zu dürfen, die Herstellung essenzieller Kooperationen zu anderen Laboren sowie die kritische Auseinandersetzung und Durchsicht der Versuche, Ergebnisse und Publikationen.

Nicht zuletzt muss ich zudem dem gesamten, im Labor tätigen Personal ein großes Dankeschön aussprechen, denn ohne das Team wäre nicht so viel Freude bei der Erstellung dieser Arbeit dabei gewesen. Den anderen Doktoranden, Annabel von Studnitz, Clarissa Bill und Nathalie Tersi danke ich für die gegenseitige Hilfe, die freundschaftliche Stimmung sowie das kurzzeitige unter die Arme greifen falls notwendig. Den Ärzten, Stefan Kassumeh und Raffael Liegl für den Respekt und die Bereitstellung des eigenen Wissens. Katja Wiedholzer und Laure Djaleu für die Organisation und Aufrechterhaltung der Laborstrukturen, ohne die die Forschung gar nicht möglich wäre.

Für die Unterstützung, die Laborinfrastruktur und den Zugang zu dem Labor und den Forschungsmitteln drücke ich meinen Dank der gesamten Augenklinik aus.

Meiner ganzen Familie gilt mein unendlicher Dank für ihre konstante mentale Unterstützung und den positiven Zuspruch. Meinen Eltern, die meine Bemühungen immer unterstützt haben und meine Wertefindung geprägt haben. Und die, wenn auch fachfremd, sich tapfer zur Korrekturlesung bereit erklärt haben. Und meinen Schwestern gilt Dank für die liebevolle, geschwisterliche Anteilnahme und kritische Auseinandersetzung mit meinem wissenschaftlichen Werdegang.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

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

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.

**Anna Hillenmayer**

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand