

Aus der
Augenklinik München
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. med. S. Priglinger



***Endogenes Galektin-1 moduliert zellbiologische Eigenschaften
von immortalisierten retinalen Pigmentepithelzellen in vitro***

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

vorgelegt von
Caspar Liesenhoff

aus
München

Jahr
2024

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

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Ohlmann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Daniela Hartmann

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Ingrid Boekhoff

Promovierte Mitbetreuerin: Prof. Dr. Claudia Priglinger

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2024

meinen Großvätern

Prof. Dr. med. Hans Liesenhoff und Dr. med. Christian Voeth

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Liesenhoff, Caspar
Name, Vorname

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

Endogenes Galektin-1 moduliert zellbiologische Eigenschaften von immortalisierten retinalen Pigmentepithelzellen in vitro

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

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

München, 24.04.2024

Caspar Liesenhoff

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Affidavit | 4 |
| Inhaltsverzeichnis | 5 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Abbildungsverzeichnis: | 7 |
| 1. Publikationsliste | 8 |
| 1.1 Beitrag zur Publikation | 8 |
| 2. Einleitung | 10 |
| 2.1 Die Retina | 10 |
| 2.2 Das retinale Pigmentepithel | 11 |
| 2.3 ARPE-19-Zellen | 16 |
| 2.4 Die proliferative Vitreoretinopathie | 17 |
| 2.5 Die epithelial-mesenchymale Transition | 19 |
| 2.6 Galektin-1 | 21 |
| 2.7 Galektin-1 Inhibitoren | 26 |
| 2.8 Fragestellung | 29 |
| 3. Zusammenfassung | 31 |
| 4. Abstract (English) | 34 |
| 5. Publikation | 36 |
| 6. Literaturverzeichnis | 37 |
| Danksagung | 47 |
| Lebenslauf | 48 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| AE2..... | N-retinylidene-N-retinylethanolamine |
| AMD..... | altersbedingte Makuladegeneration |
| bHLH..... | basic helix-loop-helix |
| BRDU..... | Bromdesoxyuridin |
| CRALBP..... | cellular retinaldehyde-binding protein |
| CRD..... | carbohydrate recognition domain |
| EGF..... | epidermal growth factor |
| EMT..... | epithelial-mesenchymale Transition |
| EZM..... | extrazelluläre Matrix |
| FACS..... | fluorescence-activated cell sorting |
| FGF..... | fibroblast growth factor |
| FGFR1..... | fibroblast growth factor receptor 1 |
| Gal..... | Galektin |
| Gemin4..... | gem nuclear organelle associated protein 4 |
| GFP..... | green fluorescent protein |
| GSK-3 β | Glykogen Synthase Kinase-3 beta |
| HSC..... | hepatische Sternzelle |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IGF..... | insulin-like growth factor |
| IL..... | Interleukin |
| ILM..... | innere limitierende Membran |
| JNK..... | jun N-terminal kinase |
| MAPK..... | p38 mitogen-activated protein kinase |
| MCP-1..... | monocyte chemotactic protein-1 |
| PDGF..... | platelet-derived growth factor |
| PDR..... | proliferative diabetische Retinopathie |
| PEDF..... | pigment epithelium-derived factor |
| PVR..... | proliferative Vitreoretinopathie |
| ROS..... | reaktive Sauerstoffspezies |
| RPE..... | retinales Pigmentepithel |
| RPE65..... | retinal pigment epithelium 65 kDa protein |
| siRNA..... | small interfering RNA |
| SMAD..... | small worm phenotype mothers against decapentaplegic |
| TGF..... | transforming growth factor |
| TNF α | tumor necrosis factor alpha α |
| VEGF..... | vascular endothelial growth factor |
| ZEB..... | zinc finger E-box-binding homeobox |
| ZO-1..... | zonula occludens protein |
| α -SMA..... | α -smooth muscle actin |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau der Retina | 11 |
| Abbildung 2: Funktionen des retinalen Pigmentepithels | 15 |
| Abbildung 3: Differenzierte ARPE-19-Zellen in der Zellkultur | 17 |
| Abbildung 4: Darstellung der unterschiedlichen Galektin-Typen sowie der Struktur von Galektin-1 | 23 |
| Abbildung 5: Der molekulare Aufbau von Anginex und OTX008 sowie Darstellung der Interaktionsstellen mit Galektin-1 | 27 |

1. Publikationsliste

Endogenous Galectin-1 Modulates Cell Biological Properties of Immortalized Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro.

Liesenhoff, C.; Paulus, S.M.; Havertz, C.; Geerlof, A.; Priglinger, S.; Priglinger, C.S.; Ohlmann, A.

International Journal of Molecular Science

Angenommen zur Publikation am 06.08.2023

Publiziert am 10.08.2023

Fundstelle:

Liesenhoff C, Paulus SM, Havertz C, Geerlof A, Priglinger S, Priglinger CS, Ohlmann A. Endogenous Galectin-1 Modulates Cell Biological Properties of Immortalized Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(16):12635. <https://doi.org/10.3390/ijms241612635>

Link: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/16/12635>

1.1 Beitrag zur Publikation

Das Forschungsvorhaben erfolgte durch Finanzierungshilfe der Deutschen Forschungsgesellschaft (Fördernummern: OH 214/4-3 und PR 1248/2-3) und nach Zustimmung der Ethikkommission der LMU München (Protokoll 19-124 vom 28.05.2019). Der Ethikantrag sowie der Antrag auf Finanzierungshilfe wurde bereits vor meinem Forschungsantritt durch meine Betreuer Prof. Dr. Andreas Ohlmann und Prof. Dr. med. Claudia Priglinger erfolgreich beantragt. Nach Einführung in die Methodik wurde der Großteil der Experimente, auf welchen diese Publikation beruht, selbständig und eigenverantwortlich durchgeführt. Darunter zählte die verantwortungsvolle Betreuung der Zellkultur, die Transfektion von ARPE-19-Zellen, die Durchführung des FACS-sortings, die Testung der Klone auf Gal-1-Defizienz via Western Blot, die Durchführung der immunhistochemischen sowie der zellbiologischen Untersuchungen der Zellmigration, Zelladhäsion, Zellproliferation und Zellviabilität. Weiterhin führte ich eigenständig, nach

Anlernung durch die Co-Autoren Katja Wildholzer und Simon Paulus, die Methodik der RNA-Isolierung, der cDNA-Synthese und der real-time-PCR durch. Während des gesamten Forschungsprojektes verwaltete ich die durch die Experimente generierten Daten und führte die statistische Auswertung durch. Nach Abschluss der Experimente erfolgte die Erstellung des Publikationsskriptes, mit Unterstützung meines Betreuers Prof. Dr. Andreas Ohlmann, maßgeblich durch mich. Die darin enthaltenen Tabellen und Grafiken wurden von mir eigenständig entworfen und verfasst. Letztlich erfolgte eine Evaluation des Publikationsskriptes durch die Co-Autorschaft, bevor die Publikation beim *International Journal of Molecular Science* eingereicht wurde. Die Veröffentlichung erfolgte nach Akzeptanz durch den Editor nach einem verblindeten peer-review-Prozess entsprechend der Standards des Herausgebers.

2. Einleitung

2.1 Die Retina

Die Netzhaut (Retina) ist ein komplexes neuronales Gewebe, welches den Augapfel vom hinteren Pol her auskleidet und eine entscheidende Rolle in der Verarbeitung von visuellen Informationen spielt (Masland, 2012) (vgl. Abb. 1). Sie besteht im lichtempfindlichen Teil (*Pars optica retinae*) aus mehreren Schichten spezialisierter Zellen (vgl. Abb. 1), die gemeinsam die visuelle Informationen erfassen und primär verarbeiten, bevor die visuellen Informationen zur Projektion ans Gehirn weitergeleitet werden (Lang, 2019). An der Ora serrata geht die *Pars optica retinae* in den lichtunempfindlichen Teil, die *Pars caeca retinae*, über (Lang, 2019). Entwicklungsgeschichtlich bildet sich die Retina als Ausstülpung des Vorderhirns (Prosencephalon), den sogenannten Augenbläschen (Grehn, 2019; Lang, 2019). Aus der inneren Wand der Augenbläschen differenzieren sich die neun Schichten der neurosensorischen Netzhaut, die äußere Wand entwickelt sich zum retinalen Pigmentepithel (RPE) (Lang, 2019). Das RPE liegt der Bruch-Membran auf, welche die Retina von der Aderhaut (Choroidea) trennt, und ist daher an der Blut-Retina-Schranke beteiligt (vgl. Abb. 1 A) (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001; Grehn, 2019). Die Verarbeitung visueller Informationen erfolgt mithilfe komplexer neuronaler Schaltkreise und Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen (Masland, 2012). Die Photorezeptorzellen (vgl. Abb. 1 B), zu denen sowohl Stäbchen als auch Zapfen gehören, erfassen das einfallende Licht und geben die visuellen Signale daraufhin an die bipolaren Zellen weiter (vgl. Abb. 1 C) (Masland, 2012). Auf dieser Ebene erfolgt bereits intraretinal eine horizontale Informationsverarbeitung über Horizontalzellen und amakrine Zellen (vgl. Abb. 1 F und G) (Grehn, 2019; Wu et al., 2023). Die bipolaren Zellen übertragen die Signale weiter auf die retinalen Ganglienzellen (vgl. Abb. 1 D), welche die verarbeiteten Informationen über ihre ca. 1,1 Millionen Axone, die am Sehnervenkopf (*Papilla nervi optici*) den Sehnerv bilden, an das Gehirn weiterleiten (Grehn, 2019; Masland, 2012).

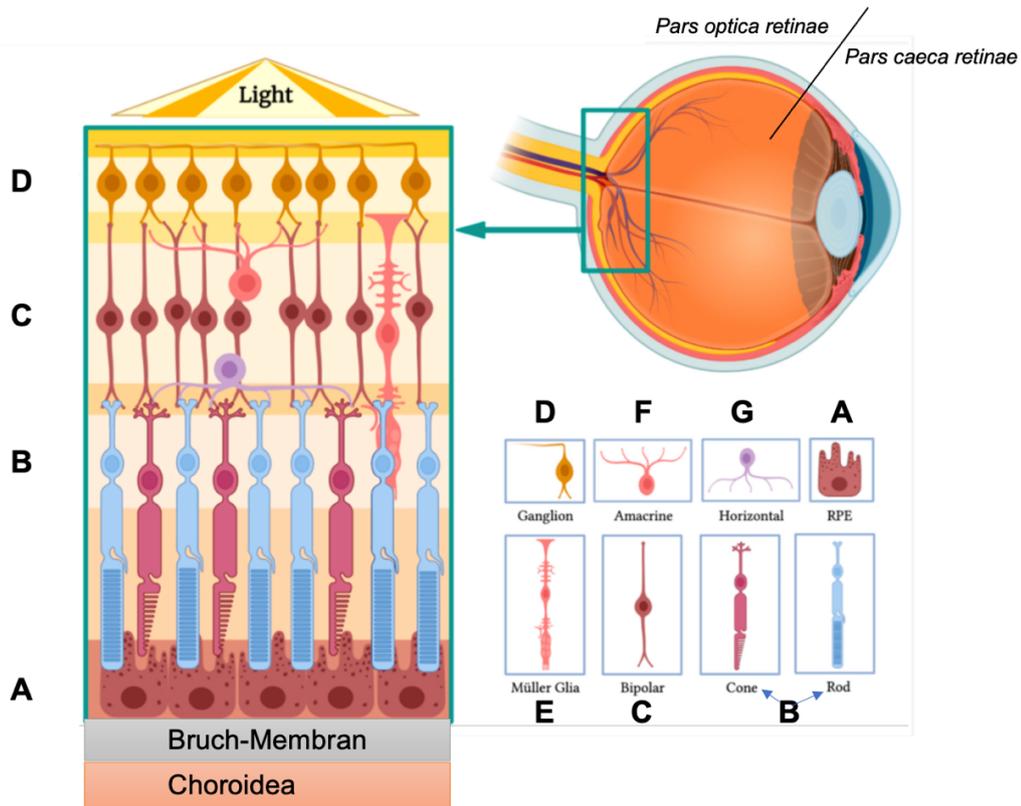


Abbildung 1: Aufbau der Retina (modifiziert nach Wu, Mina et al. 2023): Schematisch dargestellt ist die zelluläre Organisation der Netzhaut mit dem retinalen Pigmentepithel (A), den Stäbchen und Zapfen als Photorezeptoren (B), den Bipolarzellen (C), den Ganglienzellen (D), den amakrinen Zellen (F) sowie den Horizontalzellen (G).

2.2 Das retinale Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel stellt eine einlagige, pigmentierte, kubische Zellschicht dar, welche nach basal hin der Bruch-Membran aufliegt, die das RPE von dem fenestrierten Endothel der Choriokapillaris trennt (vgl. Abb. 2) (Caceres & Rodriguez-Boulan, 2020; Strauss, 2005). Die laterale Verbindung der RPE-Zellen untereinander über Tight-Junctions bildet die äußere Blut-Retina-Schranke (Cunha-Vaz et al., 2011). Die Integrität der Blut-Retina-Schranke ist entscheidend für die Regulation des trans- und parazellulären Transports und somit für die Aufrechterhaltung der eng regulierten retinalen Homöostase (O'Leary & Campbell, 2023). Störungen der Blut-Retina-Schranke können zur Bildung von

retinalen Exsudaten aus Wasser, Proteinen, Lipiden und Zellen führen, die entweder direkt oder im Rahmen einer entzündlichen, retinalen Reaktion zur Entstehung und Aufrechterhaltung von retinalen Erkrankungen beitragen (Naylor et al., 2019; Tonade & Kern, 2021; Yang et al., 2020). Nach apikal hin reicht das RPE über Mikrovilli, welche die Kontaktfläche um das 30-fache vergrößern, an die photosensitiven Außensegmente der Photorezeptoren heran. Dies ermöglicht einen intensiven metabolischen und funktionellen Austausch zwischen den RPE-Zellen und den Photorezeptoren (Naylor et al., 2019; Strauss, 2005). Sowohl Struktur als auch Lokalisation erlauben es dem RPE somit zahlreiche Funktionen im chorioretinalen Grenzbereich zu übernehmen (vgl. Abb. 2) (Lakkaraju et al., 2020; Storm et al., 2020; Strauss, 2005).

Das Licht, welches durch die brechenden Medien des Auges fokussiert wird, trifft im Bereich der Netzhaut auf eine stark mit Sauerstoff angereicherte Choriokapillaris. Dies führt in Kombination mit starker metabolischer Aktivität im umgebenden Milieu zu einem hohen Grad an oxidativem Stress (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001; Miceli et al., 1994; Strauss, 2005). Zur Reduktion des oxidativen Stresses bedienen sich die RPE-Zellen unterschiedlicher Mechanismen: Zum einen kleiden sie den Bulbus von innen aus und verringern so durch Absorption die einstrahlende Lichtenergie. Zum anderen verbessern sie die optische Qualität durch Verminderung der Streustrahlung (Sparrow et al., 2010). Das apikal befindliche Melanin führt zudem zu antioxidativen Effekten durch die Bindung von Reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) und Eisenionen (Simon et al., 2008; Źądło & Sarna, 2019). Einen weiteren protektiven Mechanismus der RPE-Zellen zur Reduktion des oxidativen Stresses bilden intrazelluläre, enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien. Als enzymatische Antioxidantien enthalten die RPE-Zellen hohe Mengen an Superoxiddismutase und Katalase. Als nicht-enzymatische Antioxidantien reichern die RPE-Zellen Carotinoide an, wie zum Beispiel Lutein und Zeaxanthin, Ascorbat, α -Tocopherol und β -Carotin (Strauss, 2005).

Durch oxidativen Stress sowie durch chemische und physikalische Faktoren, wie beispielsweise UV-Strahlung, entstehen im RPE fortlaufend Schäden an der DNA. Hierbei ist die Eigenschaft von RPE-Zellen zur DNA-Reparatur unerlässlich. (Hyttinen et al., 2017).

Ferner spielt das RPE eine entscheidende Rolle im Retinoid-Stoffwechsel des Sehprozesses: Nach der Absorption von Photonen kommt es im Bereich der Photorezeptoren zu der Bildung von *all-trans*-Retinal aus *11-cis*-Retinal (Choi et al., 2021). Das resultierende *all-trans*-Retinal wird zu *all-trans*-Retinol reduziert und zum RPE transportiert, in welchem die *trans*-zu-*cis*-Isomerisierung zur Regeneration erfolgt (Choi et al., 2021; Redmond et al., 1998). Anschließend wird *11-cis*-Retinal zurück in die Photorezeptoren transportiert und steht nach Bindung an Rhodopsin erneut zur Phototransduktion zur Verfügung (Strauss, 2005). Die Spitzen der Außensegmente der Photorezeptoren, die im Zuge des abgelaufenen Sehprozesses die höchste Konzentration an Radikalen, Licht geschädigter Proteine und Lipide enthalten, werden von den Photorezeptoren abgestoßen und in der Folge von dem RPE phagozytiert und abgebaut (Bibb & Young, 1974; Strauss, 2005; Young & Bok, 1969). Genetisch bedingte Stoffwechselstörungen, beispielsweise durch ein fehlendes oder defektes Enzym, können in Zusammenhang mit dem Sehprozess zu hereditären, retinalen Erkrankungen, wie Morbus Best oder Morbus Stargardt führen (Allikmets, 2000; Wolf, 2003). Morbus Best, die häufigste hereditäre Makuladegeneration, beruht auf einer Mutation im BEST1-Gen, welches für Bestrophin-1 codiert. Bestrophin-1 agiert als Regulator der intrazellulären Calcium-Signalgebung und spielt somit eine bedeutende Rolle in der Calcium-Homöostase des RPEs. Infolgedessen ist Bestrophin entscheidend für die Regulation der ionischen Umgebung des subretinalen Raums. Es wird angenommen, dass es durch diese Störmechanismen zu der typischen vitilliformen Ansammlung von Lipofuscin zwischen RPE und Bruch-Membran kommt, welche im weiteren Verlauf die Makuladegeneration bedingt (Guziewicz et al., 2017; Tripathy & Salini, 2023). Bei Morbus Stargardt führt eine Mutation im ABCA4-Gen, welches für eine *ATP-binding*-Kassette mit Transportfunktion codiert, zu einer Störung des retinalen Vitamin-A-Stoffwechsels. Diese Störung bedingt eine Akkumulation von A2PE, einem Vorläuferprotein von *N-retinylidene-N-retinylethanolamine* (AE2) und damit von Lipofuscin, wodurch es zum Absterben von RPE-Zellen und in der Folge zu einer retinalen Degeneration kommt (Farnoodian et al., 2022). Eine weitere wichtige Funktion des RPEs betrifft den Transport von Stoffen:

Das RPE transportiert Wasser, Ionen, Nährstoffe und Abfallprodukte über verschiedene membranöse Kanäle, Transporter und Rezeptoren, wodurch das spezifische Milieu des subretinalen Raums reguliert wird (Lehmann et al., 2014). In diesem Zusammenhang besonders bemerkenswert ist die Expression der β 2-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase, welche eine für Epithelzellen ungewöhnliche Verlagerung auf die apikale Oberfläche anstelle der basolateralen Oberfläche zeigt (Lakkaraju et al., 2020; Lobato-Álvarez et al., 2016). Neben der Na⁺/K⁺-ATPase tragen auch andere Ionenpumpen und -kanäle zur Regulation der Umgebung um die Photorezeptorzellen bei, was für deren Elektrophysiologie und Funktionsfähigkeit wichtig ist (Strauss, 2005; Wimmers et al., 2007). Darüber hinaus nimmt das RPE das für den Sehprozess essenzielle Vitamin-A aus dem Blutkreislauf auf und transportiert dieses zu den Photorezeptorzellen (Lakkaraju et al., 2020). Das RPE produziert und gibt verschiedene Wachstumsfaktoren ab, die das Überleben der Photorezeptoren, sowie die Struktur von Retina und Choriokapillaris entscheidend beeinflussen (Strauss, 2005).

Zu den sezernierten Wachstumsfaktoren gehören unter anderem *fibroblast growth factor* (FGF)-2, FGF-5, *transforming growth factor* (TGF)- β , *insulin-like growth factor* (IGF)-1, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) sowie Mitglieder der Interleukin-Familie (Hirsch et al., 2015; Kay et al., 2013; Kolomeyer et al., 2011; Strauss, 2005). PEDF erhält die Struktur der Retina und der Choriokapillaris aufrecht und hat darüber hinaus auch neuroprotektive und antiangiogene Wirkungen (Cao et al., 2001; Fudalej et al., 2021).

VEGF ist physiologischerweise entscheidend für die Aufrechterhaltung der Integrität der Choriokapillaris. Im Rahmen von neovaskulären Netzhauterkrankungen kann es jedoch durch eine Dysregulation der Signalwege von VEGF zu pathologischen choroidalen Neovaskularisationen kommen (Apte et al., 2019).

Vor diesem Hintergrund werden heutzutage effektive anti-VEGF-Therapieregime zur Behandlung von neovaskulärer AMD, diabetischer Retinopathie und retinalen Venenverschlüssen durchgeführt. Interessanterweise fanden anti-VEGF-Antikörper in Form von Bevacizumab (Avastin; Genentech; South San Francisco, CA, USA) zunächst im Bereich der antineoplastischen Therapie erfolgreich Verwen-

dung (Kabbinavar et al., 2003; Kim & D'Amore, 2012; Mukherji, 2010). Der Analogieschluss in die Augenheilkunde führte zu einem Durchbruch in der Behandlung von neovaskulären Netzhauterkrankungen: So erwies sich eine intravitreale Eingabe von anti-VEGF-Antikörpern bereits in der Primärbeschreibung als sehr wirksam (Rosenfeld et al., 2005). Mittlerweile stehen Weiterentwicklungen der anti-VEGF-Therapie in Form von Ranibizumab (Lucentis; Genentech; South San Francisco, CA, USA), Aflibercept (Eylea; Regeneron; Tarrytown, NY, USA) und Brolucizumab (Beovu; Novartis; Basel, Schweiz) zu Verfügung (Wallsh & Gallemore, 2021).

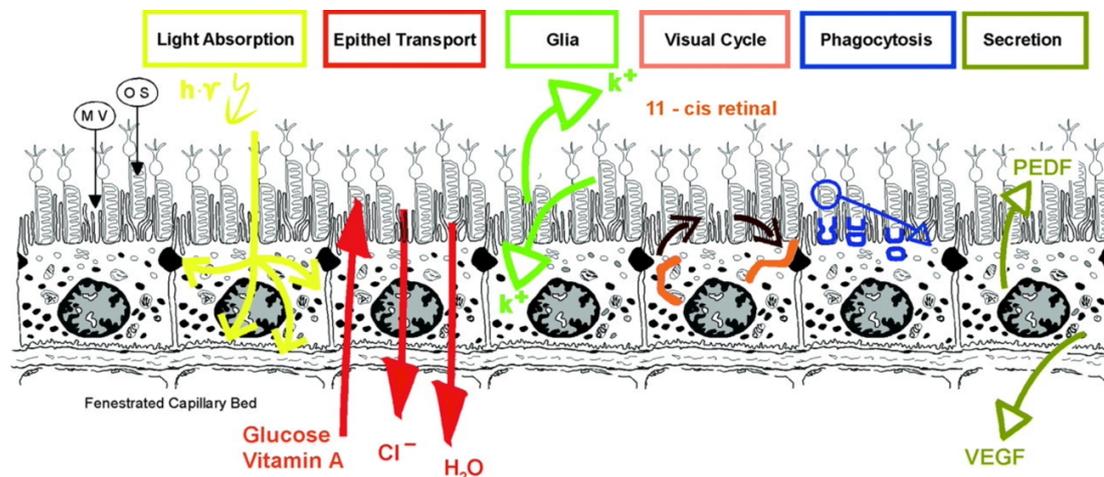


Abbildung 2: Funktionen des retinalen Pigmentepithels (modifiziert nach Strauss et al., 2005): Dargestellt ist das einschichtige retinale Pigmentepithel mit einer schematischen Zusammenfassung seiner Funktionen im chorioretinalen Grenzbereich.

Die eben genannten weitreichenden Funktionen des RPEs im chorioretinalen Raum lassen erkennen, warum es bei Störungen in der Physiologie des RPEs zur Entstehung unterschiedlicher retinaler Erkrankungen, wie beispielsweise der AMD, der diabetischen Retinopathie oder der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) kommen kann (Datta et al., 2017; Dvashi et al., 2015; Hanus et al., 2015; Tonade & Kern, 2021).

2.3 ARPE-19-Zellen

Die ARPE-19-Zelllinie ist eine menschliche RPE-Zelllinie, welche 1996 im Labor von Dunn, Aotaki-Keen et al. spontan, also zufällig und ohne methodische Transformation, aus einer primären Kultur von RPE-Zellen eines männlichen Spenders entstand (Dunn et al., 1996). Als Grundlage für die spontane Immortalisierung wird eine Translokation t(15;19) sowie zwei Translokationen t(5;15) und t(15;19) sowie eine Abberation auf Chromosom 9 angenommen (Fasler-Kan et al., 2018). Hintergrund der heutzutage weit verbreiteten Anwendung von ARPE-19-Zellen anstatt primärer RPE-Zellen ist, dass primäre RPE-Zellen in der Zellkultur nach multiplen Passagen ihren spezifischen Phänotyp verlieren und sich daher nicht für Untersuchungen eignen, die multipler Passagierungen bedürfen. Weiterhin zeigen primäre RPE-Zellen, die aus Spenderbulbi generiert werden müssen, spenderspezifische genetische Unterschiede und erschweren somit die interne und externe Validität der in Experimenten erhobenen Daten (Samuel et al., 2017). Zudem ist die Verfügbarkeit von primären RPE-Zellen aufgrund der Abhängigkeit von einer Bulbusspende eingeschränkt. Neben der Verfügbarkeit, der Vergleichbarkeit sowie der Eignung zur längerfristigen Führung in der Zellkultur bedingen folgende Charakteristika der ARPE-19-Zellen die weit verbreitete Verwendung: ARPE-19-Zellen präsentieren sich in einem epithelialen Phänotyp unter Beibehaltung der für das RPE typischen Polarisation, Barriere- und Transportfunktion (Dunn et al., 1996). In der Morphologie bedeutet dies eine RPE-typische „Pflasterstein“-artige Erscheinung und eine zunehmende Pigmentierung im Verlauf der 3-4 Wochen andauernden Differenzierung (vgl. Abb. 3). Weiterhin exprimieren ARPE-19-Zellen mehrere für RPE spezifische Gene, darunter beispielsweise das *retinal pigment epithelium 65 kDa protein* (RPE65) sowie das *cellular retinaldehyde-binding protein* (CRALBP), welche beide am Retinoidstoffwechsel und damit an der Regeneration des Sehpigments beteiligt sind (Kiser, 2022; Saari & Crabb, 2005; Samuel et al., 2017). Letztlich erfüllen ARPE-19-Zellen für das RPE typische zelluläre Funktionen wie beispielsweise die Rezeptor-vermittelte Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (Finnemann et al., 1997). Hierbei nennenswert ist, dass die Vergleichbarkeit mit primären RPE-Zellen vom Grad der Differenzierung und von der Wachstums Umgebung abhängt. Für einen hohen

Differenzierungsgrad spricht eine hohe Expression der Gene der Pigmentierung und des Sehzyklus (Samuel et al., 2017).

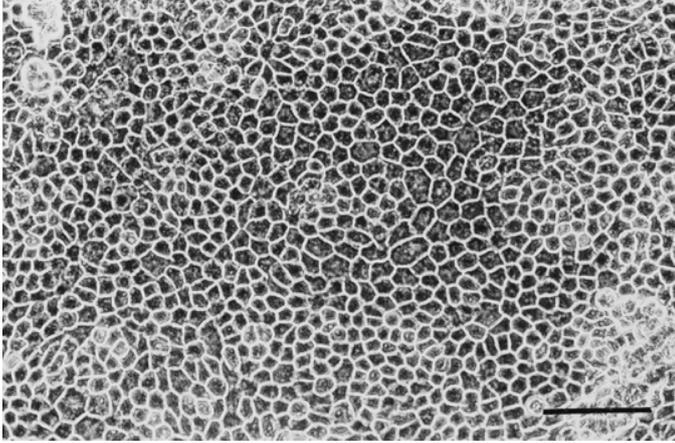


Abbildung 3: Differenzierte ARPE-19-Zellen in der Zellkultur (modifiziert nach Dunn, Aotaki-Keen et al. 1996): Die Darstellung zeigt das typische kubische, „Pflasterstein“-artige Konfigurationsmuster von konfluenten, ausdifferenzierten ARPE-19-Zellen. Man beachte die im ausdifferenzierten Zustand vorliegende Pigmentierung.

2.4 Die proliferative Vitreoretinopathie

Die proliferative Vitreoretinopathie (PVR) stellt die häufigste Komplikation (Inzidenz 5-10%) der operativen Therapie einer rhegmatogenen Netzhautablösung (Amotio retinae) und in diesem Zusammenhang die Hauptursache für eine erneute Ablösung der Netzhaut (Reamotio retinae) dar (Claes & Lafetá, 2014; Schaub et al., 2016).

Grundlage hierfür ist eine zellulär vermittelte, vitreoretinale Wundheilungsreaktion mit periretinaler, fibroproliferativer Membranbildung (Mudhar, 2020; Wiedemann & Bringmann, 2016). Die PVR-Reaktion kann prinzipiell durch unterschiedliche Auslöser wie Operationen, retinale Hypoxie, okuläre Traumata oder aufgrund entzündlicher Prozesse, wie beispielsweise einer Zytomegalie-Retinitis, hervorgerufen werden (Idrees et al., 2019; Wiedemann & Bringmann, 2016). Pathophysiologischer Hintergrund ist eine durch retinale oder choroidale Verletzung hervorgerufene Störung der Blut-Retina-Schranke und ein damit einhergehender

Kontakt von RPE-Zellen beziehungsweise Glia-Zellen mit dem Serum der Choriokapillaris. Dies führt in der Folge zu einer Proliferation, Migration und epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung insbesondere der physiologisch postmitotischen RPE-Zellen (Chiba, 2014; Priglinger et al., 2016; Wu & Elliott, 2021). Darüber hinaus kommt es durch die Produktion von Kollagen sowie anderer extrazellulärer Matrix (EZM) zur Bildung einer periretinalen Membran (Chiba, 2014; Mudhar, 2020).

Neben der zellulären Komponente spielen zudem Wachstumsfaktoren und Zytokine in der Pathogenese der PVR eine wesentliche Rolle, indem sie zelluläre Reaktionen wie Chemotaxis, Proliferation, Migration und Umbau der extrazellulären Matrix induzieren und über Interleukine an der Initiierung und Aufrechterhaltung der Inflammation beteiligt sind (Wiedemann & Bringmann, 2016; Wu & Elliott, 2021). Insbesondere der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und sein Rezeptor (PDGFR- α) wurden hierbei als Schlüsselfaktoren identifiziert (Lei et al., 2010). Bemerkenswerterweise können auch andere Wachstumsfaktoren wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der *epidermal growth factor* (EGF) den PDGF- α -Rezeptor stimulieren. Weitere an der PVR beteiligte Wachstumsfaktoren sind der *insulin-like growth factor* (IGF)-1, der *transforming growth factor* α und β (TGF)- α und TGF β , der *tumor necrosis factor* α (TNF α) und der *fibroblast growth factor* (FGF). Darüber hinaus spielen entzündliche Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, Interferon γ (IFN- γ) und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) eine bekannte Rolle in diesem Prozess (Wu & Elliott, 2021).

Bisher wurden bereits verschiedene pharmakologische Substanzen wie Kortikosteroide, 5-Fluorouracil, Daunorubicin, Retinsäure und diverse antineoplastische und antifibrotische Wirkstoffe als mögliche Therapien getestet (Ahmadi et al., 2008; Chang et al., 2008; Idrees et al., 2019; Schaub et al., 2018; Steinhorst et al., 1993; Wiedemann et al., 1998). Obwohl einige angewandte Ansätze in Tiermodellen und limitierten klinischen Studien gewisse Erfolge gezeigt haben, ist es bisher nicht gelungen, eine wirksame pharmakologische Therapie zu etablieren (Sadaka & Giuliani, 2012; Wu & Elliott, 2021).

Da keine effektive pharmakologische Möglichkeit zur Prävention und Therapie der PVR besteht, bleibt weiterhin nur die invasive, operative Versorgung mittels Vitrektomie als Behandlungsmöglichkeit bestehen. Das bedeutet, dass weiterhin

keine PVR-Reaktionen und damit einhergehende Re-Ablationen und Re-Vitrektomien, beispielsweise durch intravitreale Prophylaxe, vermieden werden können (Idrees et al., 2019). Die notwendigen Schritte der operativen Therapie umfassen die vollständige Entfernung des Glaskörpers, die Entfernung aller traktiven PVR-Membranen sowie ein Peeling der inneren limitierenden Membran (ILM) (Priglinger et al., 2021). Weiterhin kann mit Hilfe einer Retinotomie eine Entlastung der unter Traktion stehenden Netzhaut erreicht werden (Schaub et al., 2016). In fortgeschrittenen Fällen der PVR kann zudem eine Silikonöl-Endotamponade das Operationsergebnis stabilisieren (Khan et al., 2015). Insgesamt ist die funktionelle Prognose trotz adäquater Therapie der PVR oft, insbesondere wegen bleibender makulärer Veränderung, reduziert (Schaub et al., 2016). Wegen der diversen Ausprägungsformen sowie aufgrund der breiten Vielfalt der derzeit verfügbaren chirurgischen Verfahren, ist es jedoch schwierig, Daten für eine angemessene Prognoseabschätzung zu generieren (Pastor et al., 2016). Für neue therapeutische Fortschritte scheinen somit weitere Kenntnisse über die Pathophysiologie der PVR von Bedeutung zu sein, in welcher die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von retinalen RPE-Zellen eine Hauptrolle spielt (Wada et al., 2022; Wu & Elliott, 2021).

2.5 Die epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt den biologischen Prozess, in welchem differenzierte, polarisierte Epithelzellen mehrere biochemische und zellbiologische Veränderungen hin zu einem mesenchymalen Zellphänotyp durchlaufen. Im Zuge dessen kommt es zu einer erhöhter Zellmigration, Invasivität, Resistenz gegenüber Apoptose und erhöhten Produktion von EZM-Komponenten (Kalluri & Weinberg, 2009). Dieser Prozess beruht auf typischen Veränderungen in der Gen-Expression, den Signalwegen und zytoskelettalen Konfigurationen (Lamouille et al., 2014). Obwohl in der embryonalen Entwicklung des menschlichen Körpers physiologisch, kann es unter pathologischen Umständen (Entzündung, Wundheilung und Karzinogenese) in ausdifferenzierten Geweben zu einer Induktion der EMT kommen (Zhou et al., 2020). Auch im Rahmen zahlreicher retinaler Erkrankungen, wie AMD oder PVR, wurde eine Dedifferenzierung von RPE-Zellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp beobachtet. Dabei

werden im Zusammenhang mit EMT und RPE unterschiedliche Signalwege, Moleküle und Expressionsmuster diskutiert (Zhou et al., 2020).

Verschiedene Transkriptionsfaktoren wurden bereits mit der Expression von Genen der EMT in Verbindung gebracht (Gonzalez & Medici, 2014). Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren *Snail1* and *Snail2*, sowie andere *basic-helix-loop-helix*-(bHLH)-Transkriptionsfaktoren wie *zinc-finger-E-box-binding homeobox 1* (ZEB1), ZEB2 und Twist (Gonzalez & Medici, 2014). Diese haben gemein, dass sie auf der einen Seite zu einer verminderten Expression von E-Cadherin, Claudin sowie *zonula occludens protein 1* (ZO-1) führen und auf der anderen Seite die Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin, Vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA), Fibronectin-1 und β -Catenin induzieren (Chen et al., 2015; Gao et al., 2018; Gonzalez & Medici, 2014; Nieto et al., 2016; Paolillo & Schinelli, 2019). ZO-1 sowie E-Cadherin sind funktionell an der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt, welche für die Wahrung der epithelialen Struktur von Bedeutung ist (Lee et al., 2007). Alpha-SMA ist ein intrazelluläres kontraktiles Protein des Zytoskelettes, das bei der Zellbewegung eine Rolle spielt und bei der zellulären Transformation in Myofibroblasten eine entscheidene Rolle spielt (Ding et al., 2021). Vimentin, ein weiteres zytoskelettales Protein, trägt zur Stabilisierung der Zellstruktur während der Zellmigration bei (Lee et al., 2007). Fibronectin spielt eine Rolle bei der Ablagerung von Mikrofibrillen, insbesondere bei fibrotischen Prozessen (Chen et al., 2015). Der TGF- β Signalweg trägt über einen *small worm phenotype mothers against decapentaplegic* (SMAD)-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus zur EMT bei (Xu et al., 2009). Im SMAD-abhängigen Weg kommt es nach Ligandenbindung am TGF- β -Rezeptor zur Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren SMAD2 und SMAD3, die zusammen mit anderen Molekülen so genannte SMAD-Komplexe bilden und nach Translokation in den Nucleus die Transkription von Schlüsselgenen der EMT induzieren (Gonzalez & Medici, 2014). Im SMAD-unabhängigen Signalweg kommt es durch Interaktion von TGF- β mit Signalwegen der *jun N-terminal kinase* (JNK) und der *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK) zur EMT-Induktion (Zhou et al., 2020). Im Wnt-1- β -Catenin-Signalweg folgt nach der Hemmung der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) eine Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma und anschließend die Translokation von β -Catenin in den Nucleus (Liu et al., 2022). Das nukleare β -Catenin bindet dann an die Transkriptionsfaktoren für

Snails, was zu einer erhöhten Expression von *Snail* und zur Progression der EMT führt (Zhou et al., 2020). Weitere im Zusammenhang mit der EMT beschriebene Signalwege sind der Notch- sowie der Hedgehog-Signalweg, wobei bei der EMT von einer Überlappung und Synergie der einzelnen Signalwege ausgegangen wird (Gonzalez & Medici, 2014). Die Variabilität und Komplexität der an der EMT beteiligten Signalwege machen deutlich, dass ein potenzieller Inhibitor der EMT auf verschiedenen Ebenen in die pathologische Signalkaskade modulatorisch eingreifen müsste (Chen et al., 2015).

2.6 Galektin-1

Galektine stellen eine Gruppe von 15 löslichen Proteinen aus der Familie der Lektine dar, die an β -galaktosidierte Zuckerreste oder ihre Derivate binden können (Sethi et al., 2021). Grundlage für die spezifische Erkennung von kohlenhydrathaltigen Strukturen ist die *carbohydrate recognition domain* (CRD), welche aus einer konservierten Abfolge von ca. 130 Aminosäuren besteht und in ihrer tertiären Struktur eine β -Faltblatt-Struktur annimmt (Blanchard et al., 2016; Sammar et al., 2019). Durch Röntgenkristallographie konnte gezeigt werden, dass in der quartären Anordnung zwei antiparallele β -Faltblätter eine „Sandwich-Form“ annehmen, die β -Galaktosid-Epitope binden können (vgl. Abb. 4 B) (Rapoport et al., 2008; Rini & Lobsanov, 1999). Diese β -Galaktosid-Epitope sind Di- bis Tetrasaccharid-Sequenzen, welche in Oligosaccharid-Modifikationen (N- und O-Glykane) von Glykoproteinen und Glykolipiden weit verbreitet sind (Nabi et al., 2015). Zudem können Galektine, insbesondere im Zytosol und im Nucleus, auch mit Liganden interagieren, die keine β -Galactose enthalten (Johannes et al., 2018). Diese Multivalenz sowie die weitreichende Verbreitung der Liganden bedingen, dass Galektine eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie beispielsweise Migration, Transport- und Signalwege, Apoptose, prä-mRNA-Spleißen sowie Interaktionen mit der EZM beeinflussen können (Laaf et al., 2019; Sammar et al., 2019). Die Funktion der Galektine wird weiterhin durch eine Abhängigkeit der Interaktion vom Glykosilierungsstatus der potenziellen Bindungspartner diversifiziert (Priglinger et al., 2016).

Galektine können aufgrund ihrer Struktur in drei unterschiedliche Typen unterteilt werden (vgl. Abb. 4) (Hirabayashi & Kasai, 1993; Rabinovich, 2005). Die erste Gruppe stellen die Prototyp-Galektine dar, die nur eine CRD besitzen und entweder als Monomere (Galektin-5, -10 und -14) oder als nichtkovalente Dimere (Galektin-1, -2, -7, -11) vorliegen (vgl. Abb. 4 A) (Rapoport et al., 2008). Die zweite Gruppe umfasst die Tandemtyp-Galektine-4, -6, -8, -9 und -12, die durch das Vorhandensein von zwei CRDs gekennzeichnet und durch ein kurzes Linker-Peptid verbunden sind (vgl. Abb. 4 D) (Rabinovich, 2005).

Galektin-3 ist der einzige Vertreter des Chimera-Typs und kann in hoher Konzentration N-terminal zu Pentameren multimerisieren und ist daher besonders befähigt „gitterartige“ Quervernetzungen („lattices“) zu bilden (vgl. Abb. 4 C) (Modenutti et al., 2019). Das Vorliegen von Galektinen wurde für alle drei Kompartimente der Zelle (nukleär, zytoplasmal, extrazellulär) beschrieben, wobei verschiedene Gewebe unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen Galektine aufweisen (Johannes et al., 2018). Da Galektine keine klassische Signalsequenz zur Sekretion besitzen, liegen diese vornehmlich zytoplasmatisch und nukleär vor (Yang et al., 2008). Erfolgt eine Sekretion wird angenommen, dass dies über einen nicht-klassischen, vermutlich exosomalen Sekretionsweg geschieht (Nabi et al., 2015). Galektin-1 (Gal-1) ist ein 14 kDa großes Prototyp-Galektin, welches entweder als Monomer oder als non-kovalentes Homodimer mit je einer CRD pro Untereinheit vorliegt (vgl. Abb. 4 A und B) (Astorgues-Xerri, Riveiro, Tijeras-Raballand, Serova, Neuzillet, et al., 2014). Das dynamische Gleichgewicht der Homodimerisierung wird hierbei im Wesentlichen von der Konzentration beeinflusst (Cutine et al., 2021).

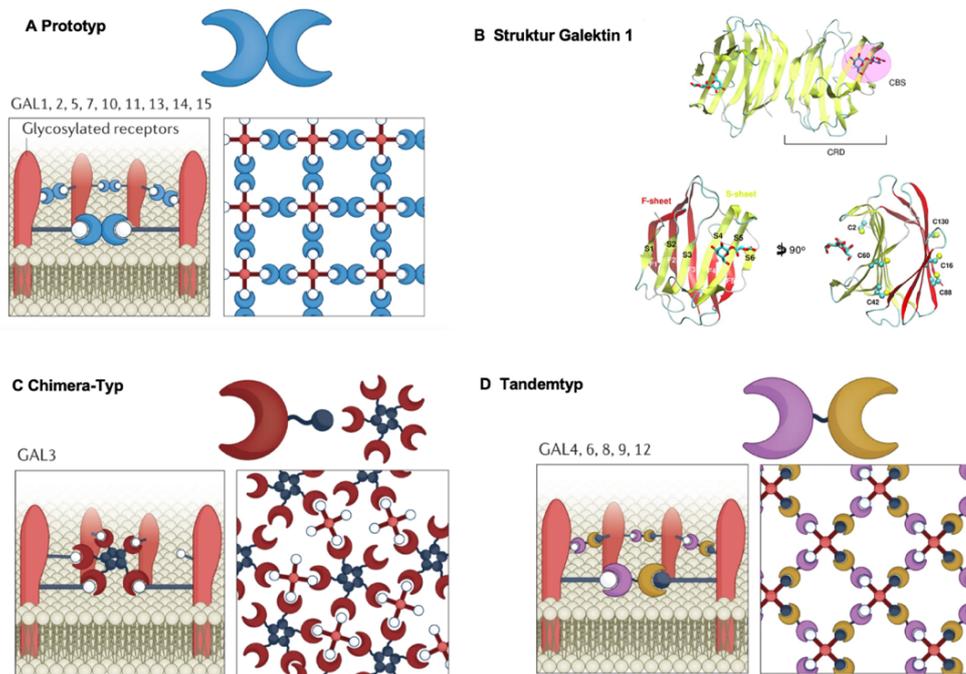


Abbildung 4: Darstellung der unterschiedlichen Galektin-Typen sowie der Struktur von Galektin-1 (modifiziert nach Mariño, Cagnoni et al., 2023 und Modenutti, Capurro et al., 2019): Dargestellt sind die unterschiedlichen Galektin-Typen sowie jeweils mit schematischer Darstellung deren Möglichkeit der „lattice“-Formierung durch Interaktion mit mehreren glykosylierten Liganden auf der Zelloberfläche und/oder extrazellulären Matrix-Glykoproteinen. Die halbmondförmige Struktur repräsentiert jeweils eine *carbohydrate recognition domain* (CRD): **A** Prototyp-Galektine **B** Die Struktur von Galektin-1 als Vertreter der Prototyp-Galektine **C** Chimäre-Galektine **D** Tandemtyp-Galektine

Das *LGALS-1*-Gen auf Chromosom 22q12 kodiert für ein 0,6 Kilobasen langes, aus 6 Exons bestehendes Transkript, aus welchem das aus 165 Aminosäuren bestehende Gal-1 translatiert wird (Camby et al., 2006). Bei der Regulation der Gal-1 Expression spielt insbesondere die Methylierung in der Promotorregion eine entscheidende Rolle (Camby et al., 2006). In der Literatur werden verschiedenen Transkriptionsfaktoren, darunter *hypoxia induced factor-1α* (HIF-1α), *nuclear factor-κB* und *activator protein-1* als Regulatoren der Gal-1 Expression beschrieben (Kanda et al., 2015). Gal-1 kann sowohl in einem reduzierten als auch oxidierten Zustand vorliegen, wobei im oxidierten Zustand keine Bindung von β-Galaktosid-Epitopen mehr möglich ist (Ito et al., 2012). Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass Gal-1 nur in seinem monomeren Zustand oxidiert werden kann (Cutine et al., 2021). Gal-1 liegt vornehmlich intrazellulär,

aber auch zu einem gewissen Anteil extrazellulär vor und wird mit einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration, Adhäsion sowie Apoptose in Verbindung gebracht (Astorgues-Xerri, Riveiro, Tijeras-Raballand, Serova, Neuzillet, et al., 2014; Camby et al., 2006).

So konnte nachgewiesen werden, dass Gal-1 mit onkogenem H-Ras interagiert, dieses stabilisiert und damit zu einer mitogenen Signalverstärkung beiträgt (Blaževič et al., 2016). In diesem Zusammenhang wurde weiterhin gezeigt, dass die Interaktion von Gal-1 mit dem EGF-Signalweg den Ruhezustand von Ras-GTP/Ras-GDP sowohl im basalen Zustand als auch nach EGF-Stimulation in Richtung Ras-GTP verschiebt und damit die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors verstärkt (Elad-Sfadia et al., 2002). Die direkte, signalverstärkende Interaktion über Zuckerreste am *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR1) unterstreicht weiterhin den proliferativen und antiapoptotischen Einfluss von Gal-1 (Chong et al., 2016). Im Zuge der EMT von hepatozellulären Karzinomen vermittelt Gal-1 über den Wnt-Signalweg die nukleäre Translokation von β -Catenin und somit die Genexpression von Cyclin D1 und c-Myc (Zhang et al., 2016). Bei Magenkarzinomen wurde eine Überexpression von Gal-1 mit erhöhter Invasivität und Metastasierungsfähigkeit in Verbindung gebracht, wobei pathophysiologisch eine Induktion der EMT gastraler Epithelzellen durch Gal-1 über den Hedgehog-Signalweg postuliert wird (Chong et al., 2016). Über eine Assoziation mit RhoA, einem Protein, welches an dem Auf- und Abbau von Aktin-Polymeren beteiligt ist, moduliert Gal-1 den zytoskelettalen Aufbau und trägt zu erhöhter Zellmobilität bei, beispielsweise in Glioblastomazellen (Camby et al., 2002). In Myofibroblasten induziert Gal-1, vermittelt über *reaktive oxygen species* (ROS) und den neuropilin-1/Smad3-Signalweg, eine Aktivierung der Proliferation und Migration (Lin et al., 2015). Im nukleären Kompartiment ist Gal-1 über eine Assoziation mit *Gem Nuclear Organelle Associated Protein 4* (Gemin4) an der posttranskriptionalen Modifikation von prä-mRNA beteiligt, weswegen auch eine Einflussnahme auf die Genexpression diskutiert wird (Park et al., 2001; Wang et al., 2011). Extrazellulär moduliert Gal-1 über verschiedene Glykokonjugat-Liganden (z.B. Laminin, Fibronectin, Integrine und Ganglioside) Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und reguliert damit Prozesse wie Entzündung und Tumor-Progression (Dings et al., 2018; Hirbe & Gutmann, 2019). Der Einfluss von Gal-1 auf unterschiedliche zellbiologische

Prozesse zeigt sich auch im Zusammenhang mit verschiedenen Pathologien des hinteren Augenabschnittes:

In in-vivo-Modellen der AMD bei Mäusen wurde ein Zusammenhang von Gal-1-Überexpression mit retinaler Neovaskularisation und Fibrosierung festgestellt, wobei pathophysiologisch eine Verstärkung der TGF- β 1 vermittelten EMT sowie eine Co-Lokalisation von Gal-1 mit dem VEGF-Rezeptor 2 angenommen wird (Wu et al., 2019). Im Rahmen der proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) zeigte sich in Glaskörperproben von Patienten mit PDR eine erhöhte Konzentration an Gal-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin konnte eine positive Korrelation zwischen Gal-1 und VEGF, dem wesentlichen angiogenen Faktor der PDR, und im Mäusemodell eine durch Gal-1 vermittelte Induktion der VEGF-Expression in Müllerzellen gezeigt werden (Abu El-Asrar et al., 2020). Interessanterweise scheint der anti-VEGF-Antikörper Aflibercept, der zu intravitrealen Therapie des diabetischen Makulaödems eingesetzt wird, eine neutralisierende Wirkung auf Gal-1 zu haben (Liberski et al., 2022; Wu et al., 2019). Diese Beobachtungen lassen eine Beteiligung von Gal-1 an der Pathogenese der PDR vermuten (Abu El-Asrar et al., 2020; Kanda et al., 2015; Ridano et al., 2017). Im Rahmen von Untersuchungen der autoimmunen Uveitis konnte gezeigt werden, dass erhöhte Antikörper gegen Gal-1 mit einer Progressivität der Erkrankung und einer eingeschränkten Prognose einhergehen (Romero & Gabius, 2019). Gal-1 wird in der Literatur vorwiegend als immunsuppressives Zytokin beschrieben (Cutine et al., 2021; Huang et al., 2021; Valli et al., 2023). Bezüglich seiner immunsuppressiven Funktion im Rahmen der autoimmunen Uveitis wird angenommen, dass zum einen Gal-1 vermehrt ins Kammerwasser abgegeben wird und zum anderen RPE-Zellen der Aktivierung von T-Zellen über Gal-1 vermittelte Mechanismen entgegensteuern (Ishida et al., 2003; Romero & Gabius, 2019). Im Zusammenhang mit der PVR konnte eine Co-Lokalisation von Galektin-1 mit Laminin und Fibronectin in der EZM von PVR-Membranen gezeigt werden (Alge et al., 2006). Die Hypothese, dass Gal-1 im Verlauf der PVR-Entwicklung eine modulatorische Funktion einnimmt, begründet sich auf folgender Beobachtung: In der Pathogenese der PVR durchlaufen RPE-Zellen eine EMT, migrieren epiretinal und tragen zur Fibrosierung und Inflammation bei (Zhou et al., 2020). In vitro zeigte sich eine positive Korrelation

von Gal-1-Expressionsleveln und eine Dedifferenzierung von RPE-Zellen, wohingegen exogen hinzugegebenes Gal-1 die Zelladhäsion sowie Migration negativ beeinflusste (Alge et al., 2006; Alge-Priglinger et al., 2009). Weiterhin wurde im Rahmen der PVR eine Interaktion von Gal-1 mit dem low-density lipoprotein und PDGF an dedifferentierten RPE-Zellen sowie eine Gal-1 vermittelte Quervernetzung mit Integrin- β 1 festgestellt (Obermann et al., 2017).

Bezüglich der Interaktion von PDGF und Gal-1 sind weiterhin die Beobachtungen von Wu, Chen et al., 2017 von besonderem Interesse: Hier konnte bei der Untersuchung von hepatischen Sternzellen (HSCs) gezeigt werden, dass Gal-1 auf der Zelloberfläche von aktivierten HSCs erleichtert bindet und dadurch Signalwege von PDGF und TGF- β verstärkt. Diese Signalwege förderten wiederum die Migration und Aktivierung von HSCs. Auf der anderen Seite unterdrückte die Blockierung der Gal-1-Expression die Migration sowie die Signalwege, die durch PDGF und TGF- β 1 ausgelöst werden (Wu et al., 2017). Bezüglich der Kanzerogenese in verschiedenen epithelialen Geweben wurden zudem weitere durch Gal-1 modulierte Signalwege (TGF- β 1, Hedgehog, PI3K/AKT) identifiziert, die zur Entstehung einer EMT von Epithelzellen beitragen (Paz et al., 2001; You et al., 2019; Zhang et al., 2016). Nicht zuletzt stellte man in RPE-Zellen von Gal-1-defizienten Mäusen eine verminderte Expression von EMT-spezifischen Genen sowie eine verminderte SMAD2 Phosphorylierung fest (Wu et al., 2019). Diese Erkenntnisse weisen also auf die Möglichkeit einer Beteiligung von Galektin-1 in der Fibrosereaktion der PVR hin und machen ersichtlich, warum die therapeutische Inhibition von Galektin-1 aktueller Gegenstand der Forschung ist.

2.7 Galektin-1 Inhibitoren

Unterschiedliche Substanzklassen wurden bereits als mögliche Inhibitoren für Galektin-1 beschrieben: Dazu gehören kleine chemische Inhibitoren, natürliche Polysaccharide, Peptide, Peptidomimetika sowie biologische Substanzen, wie *small interfering RNA* (siRNA), Aptamere und neutralisierende monoklonale Antikörper (Mariño et al., 2023). Als einer der potentesten Inhibitoren wurde das

Peptid Anginex identifiziert. Aufgrund ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften wurde dieses zu einem nicht-peptidischen niedermolekularen Topomimetikum mit der Bezeichnung OTX008 weiterentwickelt. Topomimetikum bezieht sich in diesem Zusammenhang auf den vergleichbaren hydrophoben Aufbau von Aminosäuren und einer ähnlichen Oberflächentopologie von OTX008 mit der von Anginex (vgl. Abbildung 4) (Astorgues-Xerri, Riveiro, Tijeras-Raballand, Serova, Rabinovich, et al., 2014; Thijssen et al., 2006).

OTX008 wirkt zum einen durch die Hemmung der spezifischen Kohlenhydratbindung von Galektin-1 und zum anderen dadurch, dass es nach Bindung an Galektin-1 dessen Oxidation bedingt, wodurch es zu dessen proteasomalen Abbau kommt (Astorgues-Xerri, Riveiro, Tijeras-Raballand, Serova, Rabinovich, et al., 2014; Dings et al., 2012).

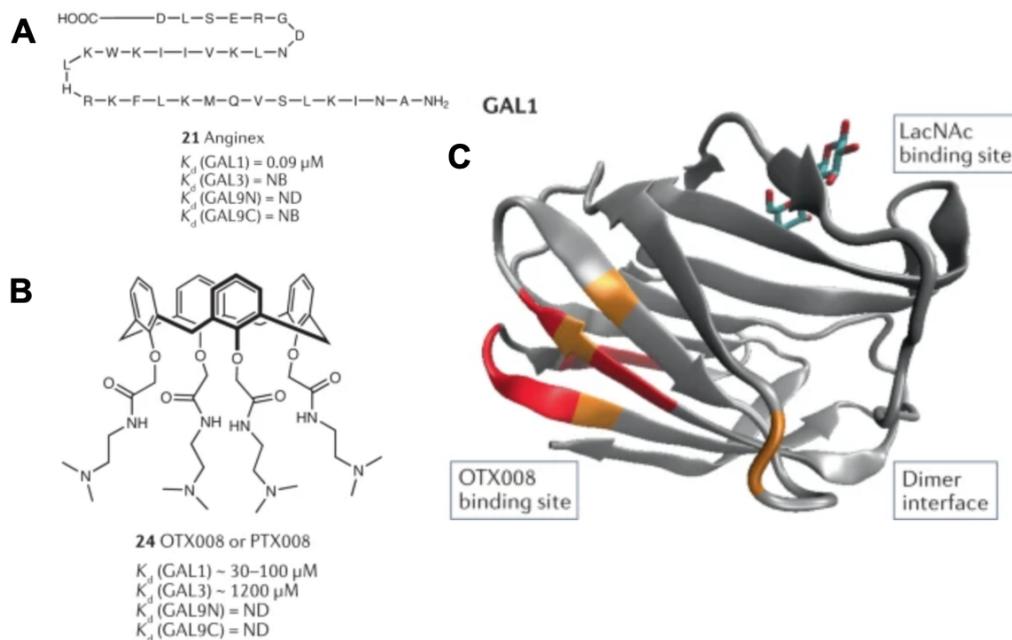


Abbildung 5: Der molekulare Aufbau von Anginex und OTX008 sowie Darstellung der Interaktionsstellen mit Galektin-1 (modifiziert nach Mariño, Cagnoni et al., 2023): Dargestellt ist: **A** der molekulare Aufbau von Anginex **B** der molekulare Aufbau von OTX008 **C** die Interaktionsstelle von OTX-008 im Bereich der β -Faltblatt-Konfiguration von Galektin-1 (rot = starke Interaktion, gelb = moderate Interaktion)

Im Bereich der antineoplastischen Therapie wurden bereits positive Ergebnisse bei der Verwendung von Gal-1-Inhibitoren und OTX008 erzielt: So konnte *in vitro* und im Mäusemodell eine antineoplastische Wirksamkeit im Rahmen des Mammakarzinoms (Dalotto-Moreno et al., 2013), des Ovarialkarzinoms (Astorgues-Xerri, Riveiro, Tijeras-Raballand, Serova, Rabinovich, et al., 2014), von Kopf-, Hals- und Schilddrüsentumoren (Gheysen et al., 2021; Koonce et al., 2017) und beim Leberzellkarzinom (Leung et al., 2019) gezeigt werden. Zudem hat OTX008 erfolgreich eine Phase-I-Studie abgeschlossen (Delord et al., 2013). Damit einhergehend konnte im Rahmen der Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Mausmodell gezeigt werden, dass OTX008 in der Lage war, das Tumorstromawachstum genauso effektiv wie Avastin zu hemmen (Koonce et al., 2017).

Nicht zuletzt vor dem Hintergrund der Erfolgsgeschichte der intravitrealen Behandlung von neovaskulären Netzhauterkrankungen mit anti-VEGF-Therapeutika scheint ein Analogieschluss in die Augenheilkunde sinnvoll. Erste wissenschaftliche Erkenntnisse von Trotta, Petrillo et al. 2022 zeigten bezüglich einer Galektin-1-Inhibition im Bereich der ophthalmologischen Forschung bereits positive Implikationen:

In vitro konnte gezeigt werden, dass OTX008 die schädlichen Auswirkungen hoher Glukosekonzentrationen auf ARPE-19-Zellen blockiert. OTX008 reduzierte hierbei nicht nur die Gal-1-Konzentration, sondern auch die des pro-fibrotischen TGF- β und zeigte zudem anti-angiogene sowie antineoplastische Eigenschaften (Trotta et al., 2022).

2.8 Fragestellung

Die Fragestellung des Forschungsvorhabens beruht zusammenfassend auf folgenden Überlegungen:

Das RPE übernimmt zahlreiche chorioretinale Funktionen, wobei eine Dysfunktion des RPEs ein entscheidender Faktor bei verschiedenen chorioretinalen Pathologien (AMD, PDR, PVR) ist. Die proliferative Vitreoretinopathie ist eine potenziell bis zur Erblindung führende Krankheit, die häufig als Komplikation nach einer Operation bei rhegmatogener Netzhautablösung auftritt und in welcher die epithelial-mesenchymale Transition von retinalen RPE-Zellen eine Hauptrolle spielt (Obermann et al., 2017). Da diverse zelluläre Mechanismen und Signalwege an der Entstehung der EMT beteiligt sind, sollte ein potenzieller Inhibitor der EMT auf verschiedenen Ebenen in die pathologische Signalkaskade modulatorisch eingreifen können. Galektine regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie beispielsweise Migration, Transport- und Signalwege, Apoptose, prä-mRNA-Spleißen sowie Interaktionen mit der EZM. Im Zusammenhang mit der EMT sowie in einer Reihe chorioretinaler Pathologien wurde das Galektin Gal-1 als modulatorisches Molekül beschrieben. Nicht zuletzt zeigte die pharmakologische Inhibition von Galektin-1 bereits mögliche Anwendungsimplicationen.

Wegweisend für die Fragestellung und das Design dieser Forschungsarbeit waren weiterhin die Erkenntnisse von Alge, Priglinger et al., 2006. In dieser Arbeit konnte mittels „*knock down*“-Experimenten gezeigt werden, dass die Inhibition von Gal-1 durch die temporäre Transfektion von RPE mit siRNA zu einer Reduktion der Migration von RPE-Zellen führt (Alge et al., 2006). In der si-RNA-Methodik wird eine spezifische siRNA über Transfektion in die Zellen eingebracht und damit die Translation des entsprechenden Zielproteins zum Teil geblockt („*knock down*“) (Li & Cha, 2007). Diese Methodik bringt jedoch folgende Limitationen mit sich: In Abhängigkeit von der Transfektionseffizienz, der Spezifität der siRNA sowie unter der Berücksichtigung der Halbwertszeit des bereits vorhandenen Proteins kann durch diese Technik nur eine Reduktion des Proteins erreicht werden, da auch die siRNA nur eine begrenzte Dauer in der Zelle aktiv ist (Capel et al., 2016). Weiterhin kommt es durch die Transfektion der Zellen mittels Lipofektion in der Regel zu einer Stressreaktion der Zellen, die unter

Umständen bis kurz vor die Durchführung der eigentlichen Experimente heranzureichen kann (Fischer-Kierzkowska et al., 2011). In der Zusammenschau lassen die über diese Technik gewonnenen Daten nur Rückschlüsse auf Prozesse unter reduzierter Expression zu. Diese Limitationen in der siRNA-Methodik begründen die Notwendigkeit der Etablierung einer stabilen Gal-1-defizienten „*knock out*“-Zelllinie, um biologische Effekte, für die nur sehr geringe Proteinkonzentrationen notwendig sind, reproduzierbar und unter physiologischen Bedingungen untersuchbar zu machen.

Somit erfolgte in dieser Forschungsarbeit die Generierung und Charakterisierung von Gal-1-defizienten, immortalisierten RPE-Zellen. Hierdurch sollte die Rolle von endogenem Gal-1 auf zellbiologische Prozesse von RPE-Zellen und damit deren potenzieller Einfluss auf die EMT sowie die Entwicklung von chorio-retinalen Pathologien untersucht werden. Die neu erlangten Erkenntnisse über die Funktionen von Gal-1 im RPE sollten perspektivisch eine fundierte Evaluation von Gal-1 oder Gal-1-Inhibitoren hinsichtlich der Prophylaxe und Therapie von proliferativen Netzhauterkrankungen ermöglichen.

3. Zusammenfassung

Zu Beginn der Arbeit erfolgte zunächst die Evaluation der biologischen Vergleichbarkeit der in den Untersuchungen verwendeten Zelllinie von ARPE-19 Zellen mit kultivierten, primären, menschlichen RPE-Zellen. Methodisch wurde dies durch eine Analyse des Expressionsmusters von RPE-spezifischen Genen in Form einer quantitativen *real-time* rt-PCR umgesetzt. Wir konnten zeigen, dass undifferenzierte ARPE-19-Zellen unter Wachstumsbedingungen im Vergleich zu kultivierten menschlichen RPE-Zellen eine niedrige Expression von Genen des Sehzyklus und der RPE-Pigmentierung aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Marker für Stoffwechsel, Phagozytose, Zytoskelett und Sekretion bei ARPE-19-Zellen im Vergleich zu kultivierten menschlichen RPE-Zellen nur geringfügig oder moderat verändert.

Die Generierung von Gal-1-defizienten ARPE-19-Zellen erfolgte mittels Transfektion mit einem sgRNA-pCRISPR-Plasmid gegen das *LGALS1*-Gen, wobei das Plasmid zusätzlich kodierende Eigenschaften für die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) besaß. Das GFP-Signal in erfolgreich transformierten Zellen ermöglichte eine Selektion von transformierten ARPE-19 Zellen mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Die Bestätigung der Gal-1-Defizienz konnte anschließend mittels Western-Blot Analysen und Immunhistochemie erfolgen. Phasenmikroskopische Untersuchungen zeigten bereits, dass Gal-1-defiziente Zellen eine elongierte, spindelzellartige Morphologie annehmen. Um die Auswirkungen von Galektin-1 auf die Viabilität von ARPE-19-Zellen zu untersuchen, wurde die Menge an reduziertem NADH in ARPE-19- und in Gal-1-defizienten ARPE-19-Zellen mittels eines WST-1-Assays gemessen. Nach 72 Stunden zeigten Gal-1-defiziente ARPE-19-Zellen eine signifikante Reduktion des WST-1-Substrats auf $(81,9 \pm 1,3\%$, Mittelwert \pm Standardfehler) im Vergleich zu den nativen ARPE-19-Zellen ($100,0 \pm 1,9$; Mittelwert \pm Standardfehler, $p < 0,001$). Um diesen Effekt auf Gal-1 zurückführen zu können, erfolgte die Inkubation von Gal-1-defizienten ARPE-19-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem Galektin-1, wobei eine geringe dosisabhängige Zunahme des WST-1-Substrats festgestellt wurde. Untersuchungen der Proliferation durch Messung der Menge in die DNA inkorporierten Bromdesoxyuridins (BRDU) zeigte eine signifikant verringerte Proliferation von Gal-1-defizienten ARPE-19-Zellen

(78,3 ± 3,3%, Mittelwert ± Standardfehler) im Vergleich zu ARPE-19 (100,0 ± 1,5%, Mittelwert ± Standardfehler, $p < 0,001$). In der Folge wurden Gal-1-defiziente ARPE-19-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem Galektin-1 inkubiert, wobei hier eine deutliche dosisabhängige Zunahme der Proliferation beobachtet werden konnte. Zur Evaluation des Migrationsverhaltens erfolgte die Durchführung eines *scratch-migration-assays*, in welchem ein zellfreier Korridor in einem konfluenten Zellrasen erzeugt und anschließend die rekolonisierte Fläche in Prozent evaluiert wird. Hier zeigte sich bei Gal-1-defizienten ARPE-19-Zellen ein vermindertes Migrationsverhalten (36.3 ± 2.5%, Mittelwert ± Standardfehler) im Vergleich zu ARPE-19 (46.0 ± 2.4%, Mittelwert ± Standardfehler, $p = 0,014$). Untersuchungen der Zelladhäsion ergaben, dass 30 Minuten nach Aussaat signifikant mehr (32 ± 4%, Mittelwert ± Standardfehler, $p < 0.001$) Gal-1-defiziente ARPE-19-Zellen Adhärenz zeigten als native ARPE-19-Zellen (9 ± 8%, Mittelwert ± Standardfehler). Diese erhöhte Adhärenz blieb bis zu 150 Minuten nach der Aussaat bestehen. Die Zugabe von rekombinantem-Galektin-1 führte im Gegenzug zu einer verringerten Adhärenz. Aufgrund der bereits beschriebenen zellmorphologischen Auffälligkeit der Gal-1-defizienten ARPE-19-Zellen erfolgte eine Evaluation hinsichtlich einer möglichen Induktion einer EMT durch fehlendes Gal-1. In der durchgeführten immunhistochemischen Färbung zeigte sich eine erhöhte Expression von α -SMA und N-Cadherin bei Gal-1-defizienten ARPE-19 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zudem ergab sich eine erhöhte mRNA-Expression von α -SMA ($p = 0,001$) und N-Cadherin ($p = 0,005$). Diese Beobachtungen implizieren, dass im physiologischen Zustand Gal-1 zum differenzierten epithelialen Phänotyp von ARPE-19-Zellen beiträgt. Um zu untersuchen, ob Gal-1-defiziente ARPE-19-Zellen mit einer kompensatorischen Erhöhung der Expression von anderen Galektinen reagieren, erfolgte die Durchführung einer quantitativen *real-time* rt-PCR. Für Galektin-8 konnte eine gesteigerte Expression ($p = 0,034$) festgestellt werden. Dies deutet stark darauf hin, dass eine Gal-1-Defizienz zu einer kompensatorisch gesteigerten Expression von Galektin-8 in ARPE-19-Zellen führt. Für Galektin-3 wiederum konnte keine gesteigerte Expression festgestellt werden.

Zusammenfassend lassen unsere Experimente die Schlussfolgerung zu, dass das komplette Fehlen von Galektin-1 in ARPE-19-Zellen zu einer verringerten Proliferation, Viabilität und Migration sowie zu einer gesteigerten Adhäsion führt.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass ein komplettes Fehlen von Gal-1 in ARPE-19-Zellen eine EMT hin zu einem mesenchymalen Phänotyp bewirkt.

4. Abstract (English)

At the beginning of the study, the biological comparability of the ARPE-19 cell line used in the investigations with cultured primary human retinal pigment epithelial (RPE) cells was evaluated. This was methodically achieved by analyzing the expression pattern of RPE-specific genes using quantitative real-time rt-PCR. Undifferentiated ARPE-19 cells, under growth conditions, exhibited lower expression of genes related to the visual cycle and RPE pigmentation compared to cultured human RPE cells. However, markers for metabolism, phagocytosis, cytoskeleton, and secretion in ARPE-19 cells showed only slight or moderate changes compared to cultured human RPE cells.

Gal-1-deficient ARPE-19 cells were generated by transfection with an sgRNA-pCRISPR plasmid targeting the LGALS1 gene, which also encoded green fluorescent protein (GFP). Successful transformation was confirmed by GFP signal, allowing selection of transformed ARPE-19 cells through fluorescence-activated cell sorting (FACS). Confirmation of Gal-1 deficiency was subsequently performed through Western blot analyses and immunohistochemistry. Phase-contrast microscopy revealed an elongated, spindle-shaped morphology in Gal-1-deficient cells. To investigate the effects of Gal-1 on the viability of ARPE-19 cells, the amount of reduced NADH in ARPE-19 and Gal-1-deficient ARPE-19 cells was measured using a WST-1 assay. After 72 hours, Gal-1-deficient ARPE-19 cells showed a significant reduction in WST-1 substrate ($81.9 \pm 1.3\%$, mean \pm standard error) compared to native ARPE-19 cells (100.0 ± 1.9 ; mean \pm standard error, $p < 0.001$). To attribute this effect to Gal-1, Gal-1-deficient ARPE-19 cells were incubated with various concentrations of recombinant Gal-1, revealing a dose-dependent increase in WST-1 substrate. Proliferation, assessed by measuring bromodeoxyuridine (BrdU) incorporated into DNA, showed significantly reduced proliferation in Gal-1-deficient ARPE-19 cells ($78.3 \pm 3.3\%$, mean \pm standard error) compared to ARPE-19 ($100.0 \pm 1.5\%$, mean \pm standard error, $p < 0.001$). Incubation of Gal-1-deficient ARPE-19 cells with different concentrations of recombinant Gal-1 led to a dose-dependent increase in proliferation. A scratch migration assay demonstrated reduced migration behavior in Gal-1-deficient ARPE-19 cells ($36.3 \pm 2.5\%$, mean \pm standard error) compared to ARPE-19 ($46.0 \pm 2.4\%$, mean

\pm standard error, $p = 0.014$). Cell adhesion studies revealed significantly increased adhesion in Gal-1-deficient ARPE-19 cells ($32 \pm 4\%$, mean \pm standard error, $p < 0.001$) compared to native ARPE-19 cells ($9 \pm 8\%$, mean \pm standard error) 30 minutes after seeding, persisting up to 150 minutes after seeding. Addition of recombinant Gal-1 resulted in decreased adhesion. Due to the observed morphological abnormalities in Gal-1-deficient ARPE-19 cells, an evaluation regarding the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) was performed. Immunohistochemical staining showed increased expression of α -SMA and N-cadherin in Gal-1-deficient ARPE-19 cells compared to control cells. Additionally, increased mRNA expression of α -SMA ($p=0.001$) and N-cadherin ($p=0.005$) was observed. These findings imply that Gal-1 contributes to the differentiated epithelial phenotype of ARPE-19 cells under physiological conditions.

To investigate whether Gal-1-deficient ARPE-19 cells respond with compensatory increased expression of other galectins, a quantitative real-time rt-PCR was conducted. Testing for galectin-3 and -8 was performed as both galectins are expressed in the retina's RPE region, representing different subtypes of galectins, and have been associated with pathological retinal diseases. (Caridi, Doncheva et al. 2021). An increased expression of galectin-8 ($p=0.034$) was observed, strongly suggesting that Gal-1 deficiency leads to compensatory upregulation of galectin-8 in ARPE-19 cells. However, no increased expression of galectin-3 was found.

In summary, our experiments suggest that the absence of Gal-1 in ARPE-19 cells leads to reduced proliferation, viability, and migration, along with increased adhesion. Complete lack of Gal-1 in ARPE-19 cells appears to induce EMT towards a mesenchymal phenotype.

5. Publikation

Endogenous Galectin-1 Modulates Cell Biological Properties of Immortalized Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro.

Liesenhoff, C.; Paulus, S.M.; Havertz, C.; Geerlof, A.; Priglinger, S.; Priglinger, C.S.; Ohlmann, A.

International Journal of Molecular Science

Angenommen zur Publikation am 06.08.2023

Publiziert am 10.08.2023

Fundstelle:

Liesenhoff C, Paulus SM, Havertz C, Geerlof A, Priglinger S, Priglinger CS, Ohlmann A. Endogenous Galectin-1 Modulates Cell Biological Properties of Immortalized Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(16):12635. <https://doi.org/10.3390/ijms241612635>

Link: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/16/12635>

6. Literaturverzeichnis

- Abu El-Asrar, A. M., Ahmad, A., Allegaert, E., Siddiquei, M. M., Alam, K., Gikandi, P. W., De Hertogh, G., & Opdenakker, G. (2020). Galectin-1 studies in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*, 98(1), e1-e12. <https://doi.org/10.1111/aos.14191>
- Ahmadih, H., Fegghi, M., Tabatabaei, H., Shoeibi, N., Ramezani, A., & Mohebbi, M. R. (2008). Triamcinolone acetonide in silicone-filled eyes as adjunctive treatment for proliferative vitreoretinopathy: a randomized clinical trial. *Ophthalmology*, 115(11), 1938-1943. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.05.016>
- Alge, C. S., Priglinger, S. G., Kook, D., Schmid, H., Haritoglou, C., Welge-Lussen, U., & Kampik, A. (2006). Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(1), 415-426. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0308>
- Alge-Priglinger, C. S., André, S., Kreutzer, T. C., Deeg, C. A., Kampik, A., Kernt, M., Schöffl, 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, 2162-2173.
- Allikmets, R. (2000). Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease. *Am J Hum Genet*, 67(4), 793-799. <https://doi.org/10.1086/303100>
- Apte, R. S., Chen, D. S., & Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6), 1248-1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M. E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Neuzillet, C., Albert, S., Raymond, E., & Faivre, S. (2014). Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev*, 40(2), 307-319. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.07.007>
- Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M. E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Rabinovich, G. A., Bieche, I., Vidaud, M., de Gramont, A., Martinet, M., Cvitkovic, E., Faivre, S., & Raymond, E. (2014). OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*, 50(14), 2463-2477. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.06.015>
- Bibb, C., & Young, R. W. (1974). Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *J Cell Biol*, 61(2), 327-343. <https://doi.org/10.1083/jcb.61.2.327>
- Blanchard, H., Bum-Erdene, K., Bohari, M. H., & Yu, X. (2016). Galectin-1 inhibitors and their potential therapeutic applications: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 26(5), 537-554. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1163338>
- Blaževič, O., Mideksa, Y. G., Šolman, M., Ligabue, A., Ariotti, N., Nakhaeizadeh, H., Fansa, E. K., Papageorgiou, A. C., Wittinghofer, A., Ahmadian, M. R., & Abankwa, D. (2016). Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering. *Sci Rep*, 6, 24165. <https://doi.org/10.1038/srep24165>
- Boulton, M., & Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)*, 15(Pt 3), 384-389. <https://doi.org/10.1038/eye.2001.141>
- Caceres, P. S., & Rodriguez-Boulan, E. (2020). Retinal pigment epithelium polarity in health and blinding diseases. *Curr Opin Cell Biol*, 62, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.08.001>

- Camby, I., Belot, N., Lefranc, F., Sadeghi, N., de Launoit, Y., Kaltner, H., Musette, S., Darro, F., Danguy, A., Salmon, I., Gabius, H. J., & Kiss, R. (2002). Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol*, *61*(7), 585-596. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.7.585>
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., & Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, *16*(11), 137r-157r. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl025>
- Cao, W., Tombran-Tink, J., Elias, R., Sezate, S., Mrazek, D., & McGinnis, J. F. (2001). In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *42*(7), 1646-1652.
- Capel, V., Vllasaliu, D., Watts, P., & Stolnik, S. (2016). Insight into the relationship between the cell culture model, cell trafficking and siRNA silencing efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, *477*(2), 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.054>
- Chang, Y. C., Hu, D. N., & Wu, W. C. (2008). Effect of oral 13-cis-retinoic acid treatment on postoperative clinical outcome of eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*, *146*(3), 440-446. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.05.002>
- Chen, Z., Shao, Y., & Li, X. (2015). The roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR. *Mol Vis*, *21*, 706-710.
- Chiba, C. (2014). The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. *Exp Eye Res*, *123*, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.009>
- Choi, E. H., Daruwalla, A., Suh, S., Leinonen, H., & Palczewski, K. (2021). Retinoids in the visual cycle: role of the retinal G protein-coupled receptor. *J Lipid Res*, *62*, 100040. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR120000850>
- Chong, Y., Tang, D., Gao, J., Jiang, X., Xu, C., Xiong, Q., Huang, Y., Wang, J., Zhou, H., Shi, Y., & Wang, D. (2016). Galectin-1 induces invasion and the epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cells via non-canonical activation of the hedgehog signaling pathway. *Oncotarget*, *7*(50), 83611-83626. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13201>
- Claes, C., & Lafetá, A. P. (2014). Proliferative vitreoretinopathy. *Dev Ophthalmol*, *54*, 188-195. <https://doi.org/10.1159/000360466>
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., & Lobo, C. (2011). Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*, *21 Suppl 6*, S3-9. <https://doi.org/10.5301/ejo.2010.6049>
- Cutine, A. M., Bach, C. A., Veigas, F., Merlo, J. P., Laporte, L., Manselle Cocco, M. N., Massaro, M., Sarbia, N., Perrotta, R. M., Mahmoud, Y. D., & Rabinovich, G. A. (2021). Tissue-specific control of galectin-1-driven circuits during inflammatory responses. *Glycobiology*, *31*(8), 891-907. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab007>
- Dalotto-Moreno, T., Croci, D. O., Cerliani, J. P., Martinez-Allo, V. C., Dergan-Dylon, S., Méndez-Huergo, S. P., Stupirski, J. C., Mazal, D., Osinaga, E., Toscano, M. A., Sundblad, V., Rabinovich, G. A., & Salatino, M. (2013). Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res*, *73*(3), 1107-1117. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-2418>
- Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., & Handa, J. T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular

- AMD. *Prog Retin Eye Res*, 60, 201-218.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.03.002>
- Delord, J.-P., Awada, A., Raymond, E., Lokiec, F., Herait, P., Rezai, K., Lachaux, N., Rabinovich, G. A., Gomez-Roca, C., Aftimos, P., Faivre, S., & Stupirski, J. C. (2013). Abstract A72: A first-in-man Phase I study of the galectin-1 (gal-1) inhibitor OTX008 given subcutaneously as a single agent to patients with advanced solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(11_Supplement), A72-A72. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Targ-13-a72>
- Ding, H., Chen, J., Qin, J., Chen, R., & Yi, Z. (2021). TGF- β -induced α -SMA expression is mediated by C/EBP β acetylation in human alveolar epithelial cells. *Mol Med*, 27(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00283-6>
- Dings, R. P., Miller, M. C., Nesmelova, I., Astorgues-Xerri, L., Kumar, N., Serova, M., Chen, X., Raymond, E., Hoye, T. R., & Mayo, K. H. (2012). Antitumor agent calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding. *J Med Chem*, 55(11), 5121-5129.
<https://doi.org/10.1021/jm300014q>
- Dings, R. P. M., Miller, M. C., Griffin, R. J., & Mayo, K. H. (2018). Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci*, 19(3).
<https://doi.org/10.3390/ijms19030905>
- Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R., & Hjelmeland, L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*, 62(2), 155-169. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0020>
- Dvashi, Z., Goldberg, M., Adir, O., Shapira, M., & Pollack, A. (2015). TGF- β 1 induced transdifferentiation of rpe cells is mediated by TAK1. *PLoS One*, 10(4), e0122229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122229>
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H. J., & Kloog, Y. (2002). Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 277(40), 37169-37175.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M205698200>
- Farnoodian, M., Bose, D., Khristov, V., Susaimanickam, P. J., Maddileti, S., Mariappan, I., Abu-Asab, M., Campos, M., Villasmil, R., Wan, Q., Maminishkis, A., McGaughey, D., Barone, F., Gundry, R. L., Riordon, D. R., Boheler, K. R., Sharma, R., & Bharti, K. (2022). Cell-autonomous lipid-handling defects in Stargardt iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. *Stem Cell Reports*, 17(11), 2438-2450. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.10.001>
- Fasler-Kan, E., Aliu, N., Wunderlich, K., Ketterer, S., Ruggiero, S., Berger, S., & Meyer, P. (2018). The Retinal Pigment Epithelial Cell Line (ARPE-19) Displays Mosaic Structural Chromosomal Aberrations. *Methods Mol Biol*, 1745, 305-314.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7680-5_17
- Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D., & Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires α (v) β 5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 12932-12937. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12932>
- Fischer-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarzab, M., Lisowska, K. M., & Krawczyk, Z. (2011). Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol Biol*, 12, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-27>
- Fudalej, E., Justyniarska, M., Kasarełto, K., Dziedziak, J., Szaflik, J. P., & Cudnoch-Jędrzejewska, A. (2021). Neuroprotective Factors of the Retina and Their Role

- in Promoting Survival of Retinal Ganglion Cells: A Review. *Ophthalmic Res*, 64(3), 345-355. <https://doi.org/10.1159/000514441>
- Gao, S., Hu, J., Wu, X., & Liang, Z. (2018). PMA treated THP-1-derived-IL-6 promotes EMT of SW48 through STAT3/ERK-dependent activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 108, 618-624. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.067>
- Gheysen, L., Soumoy, L., Trelcat, A., Verset, L., Journe, F., & Saussez, S. (2021). New Treatment Strategy Targeting Galectin-1 against Thyroid Cancer. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051112>
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7(344), re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>
- Grehn, F. (2019). Netzhaut. In *Augenheilkunde* (pp. 281-356). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-59154-3_14
- Guziewicz, K. E., Sinha, D., Gómez, N. M., Zorych, K., Dutrow, E. V., Dhingra, A., Mullins, R. F., Stone, E. M., Gamm, D. M., Boesze-Battaglia, K., & Aguirre, G. D. (2017). Bestrophinopathy: An RPE-photoreceptor interface disease. *Prog Retin Eye Res*, 58, 70-88. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.005>
- Hanus, J., Anderson, C., & Wang, S. (2015). RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Res Rev*, 24(Pt B), 286-298. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.09.002>
- Hirabayashi, J., & Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 3(4), 297-304. <https://doi.org/10.1093/glycob/3.4.297>
- Hirbe, A. C., & Gutmann, D. H. (2019). Understanding a complicated Gal-1. *Neuro Oncol*, 21(11), 1341-1343. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz165>
- Hirsch, L., Nazari, H., Sreekumar, P. G., Kannan, R., Dustin, L., Zhu, D., Barron, E., & Hinton, D. R. (2015). TGF- β 2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented. *Cytokine*, 71(2), 394-396. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.014>
- Huang, Y., Wang, H. C., Zhao, J., Wu, M. H., & Shih, T. C. (2021). Immunosuppressive Roles of Galectin-1 in the Tumor Microenvironment. *Biomolecules*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/biom11101398>
- Hyttinen, J. M. T., Błasiak, J., Niittykoski, M., Kinnunen, K., Kauppinen, A., Salminen, A., & Kaarniranta, K. (2017). DNA damage response and autophagy in the degeneration of retinal pigment epithelial cells-Implications for age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res Rev*, 36, 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.03.006>
- Idrees, S., Sridhar, J., & Kuriyan, A. E. (2019). Proliferative Vitreoretinopathy: A Review. *Int Ophthalmol Clin*, 59(1), 221-240. <https://doi.org/10.1097/iio.0000000000000258>
- Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z., & Streilein, J. W. (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm*, 11(2), 91-105. <https://doi.org/10.1076/ocii.11.2.91.15914>
- Ito, K., Stannard, K., Gabutero, E., Clark, A. M., Neo, S. Y., Onturk, S., Blanchard, H., & Ralph, S. J. (2012). Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in

- the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 763-778.
<https://doi.org/10.1007/s10555-012-9388-2>
- Johannes, L., Jacob, R., & Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *J Cell Sci*, 131(9).
<https://doi.org/10.1242/jcs.208884>
- Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S., & Bergsland, E. (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21(1), 60-65.
<https://doi.org/10.1200/jco.2003.10.066>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/jci39104>
- Kanda, A., Noda, K., Saito, W., & Ishida, S. (2015). Aflibercept Traps Galectin-1, an Angiogenic Factor Associated with Diabetic Retinopathy. *Sci Rep*, 5, 17946.
<https://doi.org/10.1038/srep17946>
- Kay, P., Yang, Y. C., & Paraoan, L. (2013). Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. *J Cell Mol Med*, 17(7), 833-843.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12070>
- Khan, M. A., Brady, C. J., & Kaiser, R. S. (2015). Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update. *Retina*, 35(2), 165-175.
<https://doi.org/10.1097/iae.0000000000000447>
- Kim, L. A., & D'Amore, P. A. (2012). A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. *Am J Pathol*, 181(2), 376-379.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.006>
- Kiser, P. D. (2022). Retinal pigment epithelium 65 kDa protein (RPE65): An update. *Prog Retin Eye Res*, 88, 101013.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101013>
- Kolomeyer, A. M., Sugino, I. K., & Zarbin, M. A. (2011). Characterization of conditioned media collected from cultured adult versus fetal retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(8), 5973-5986. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6965>
- Koonce, N. A., Griffin, R. J., & Dings, R. P. M. (2017). Galectin-1 Inhibitor OTX008 Induces Tumor Vessel Normalization and Tumor Growth Inhibition in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Models. *Int J Mol Sci*, 18(12).
<https://doi.org/10.3390/ijms18122671>
- Laaf, D., Bojarová, P., Elling, L., & Křen, V. (2019). Galectin-Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends Biotechnol*, 37(4), 402-415.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.001>
- Lakkaraju, A., Umapathy, A., Tan, L. X., Daniele, L., Philp, N. J., Boesze-Battaglia, K., & Williams, D. S. (2020). The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 100846. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100846>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196.
<https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lang, G. K. (2019). *Augenheilkunde* (Vol. 6). Georg Thieme Verlag (Stuttgart).
<https://doi.org/10.1055/b-006-163269>
- Lee, H., O'Meara, S. J., O'Brien, C., & Kane, R. (2007). The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative

- vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(9), 4291-4299.
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-0086>
- Lehmann, G. L., Benedicto, I., Philp, N. J., & Rodriguez-Boulan, E. (2014). Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Exp Eye Res*, 126, 5-15. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.021>
- Lei, H., Rheaume, M. A., & Kazlauskas, A. (2010). Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res*, 90(3), 376-381. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.11.003>
- Leung, Z., Ko, F. C. F., Tey, S. K., Kwong, E. M. L., Mao, X., Liu, B. H. M., Ma, A. P. Y., Fung, Y. M. E., Che, C. M., Wong, D. K. H., Lai, C. L., Ng, I. O., & Yam, J. W. P. (2019). Galectin-1 promotes hepatocellular carcinoma and the combined therapeutic effect of OTX008 galectin-1 inhibitor and sorafenib in tumor cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1), 423. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1402-x>
- Li, W., & Cha, L. (2007). Predicting siRNA efficiency. *Cell Mol Life Sci*, 64(14), 1785-1792. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7057-3>
- Liberski, S., Wichrowska, M., & Kocięcki, J. (2022). Aflibercept versus Faricimab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Macular Edema: A Review. *Int J Mol Sci*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169424>
- Lin, Y. T., Chen, J. S., Wu, M. H., Hsieh, I. S., Liang, C. H., Hsu, C. L., Hong, T. M., & Chen, Y. L. (2015). Galectin-1 accelerates wound healing by regulating the neuropilin-1/Smad3/NOX4 pathway and ROS production in myofibroblasts. *J Invest Dermatol*, 135(1), 258-268. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.288>
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
- Lobato-Álvarez, J. A., Roldán, M. L., López-Murillo, T. D., González-Ramírez, R., Bonilla-Delgado, J., & Shoshani, L. (2016). The Apical Localization of Na(+), K(+)-ATPase in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells Depends on Expression of the β (2) Subunit. *Front Physiol*, 7, 450. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00450>
- Mariño, K. V., Cagnoni, A. J., Croci, D. O., & Rabinovich, G. A. (2023). Targeting galectin-driven regulatory circuits in cancer and fibrosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(4), 295-316. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00636-2>
- Masland, R. H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2), 266-280. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.002>
- Miceli, M. V., Liles, M. R., & Newsome, D. A. (1994). Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res*, 214(1), 242-249. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1254>
- Modenutti, C. P., Capurro, J. I. B., Di Lella, S., & Martí, M. A. (2019). The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Front Chem*, 7, 823. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00823>
- Mudhar, H. S. (2020). A brief review of the histopathology of proliferative vitreoretinopathy (PVR). *Eye (Lond)*, 34(2), 246-250. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0724-4>

- Mukherji, S. K. (2010). Bevacizumab (Avastin). *AJNR Am J Neuroradiol*, *31*(2), 235-236. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1987>
- Nabi, I. R., Shankar, J., & Dennis, J. W. (2015). The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci*, *128*(13), 2213-2219. <https://doi.org/10.1242/jcs.151159>
- Naylor, A., Hopkins, A., Hudson, N., & Campbell, M. (2019). Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. *Int J Mol Sci*, *21*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010211>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, *166*(1), 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- O'Leary, F., & Campbell, M. (2023). The blood-retina barrier in health and disease. *Febs j*, *290*(4), 878-891. <https://doi.org/10.1111/febs.16330>
- Obermann, J., Priglinger, C. S., Merl-Pham, J., Geerlof, A., Priglinger, S., Götz, 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*(8), 1528-1546. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.066381>
- Paolillo, M., & Schinelli, S. (2019). Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int J Mol Sci*, *20*(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194947>
- Park, J. W., Voss, P. G., Grabski, S., Wang, J. L., & Patterson, R. J. (2001). Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res*, *29*(17), 3595-3602. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.3595>
- Pastor, J. C., Rojas, J., Pastor-Idoate, S., Di Lauro, S., Gonzalez-Buendia, L., & Delgado-Tirado, S. (2016). Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Prog Retin Eye Res*, *51*, 125-155. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.005>
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., & Kloog, Y. (2001). Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, *20*(51), 7486-7493. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204950>
- 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 β 1,6-N-Glycosylation and Increased Susceptibility to Galectin-3 Binding. *PLoS One*, *11*(1), e0146887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146887>
- Priglinger, S. G., Siedlecki, J., Hattenbach, L. O., & Grisanti, S. (2021). [Proliferative vitreoretinopathy (PVR) surgery: Scar Wars : Five steps to successful treatment of PVR detachment]. *Ophthalmologe*, *118*(1), 18-23. <https://doi.org/10.1007/s00347-020-01293-1> (Proliferative Vitreoretinopathie(PVR)-Chirurgie: „Scar Wars“ : Fünf Schritte zur erfolgreichen Therapie der PVR-Amotio.)
- Rabinovich, G. A. (2005). Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer*, *92*(7), 1188-1192. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602493>
- Rapoport, E. M., Kurmyshkina, O. V., & Bovin, N. V. (2008). Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry (Mosc)*, *73*(4), 393-405. <https://doi.org/10.1134/s0006297908040032>
- Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J. X., Crouch, R. K., & Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-

- cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet*, 20(4), 344-351.
<https://doi.org/10.1038/3813>
- 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., & Sánchez, M. C. (2017). Galectin-1 expression imprints a neurovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF. *Oncotarget*, 8(20), 32505-32522. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17129>
- Rini, J. M., & Lobsanov, Y. D. (1999). New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol*, 9(5), 578-584. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00008-1](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00008-1)
- Romero, A., & Gabius, H. J. (2019). Galectin-3: is this member of a large family of multifunctional lectins (already) a therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets*, 23(10), 819-828. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1675638>
- Rosenfeld, P. J., Moshfeghi, A. A., & Puliafito, C. A. (2005). Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 36(4), 331-335.
- Saari, J. C., & Crabb, J. W. (2005). Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP). *Exp Eye Res*, 81(3), 245-246.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.06.015>
- Sadaka, A., & Giuliari, G. P. (2012). Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments. *Clin Ophthalmol*, 6, 1325-1333.
<https://doi.org/10.2147/opth.S27896>
- Sammar, M., Drobnjak, T., Mandala, M., Gizurarson, S., Huppertz, B., & Meiri, H. (2019). Galectin 13 (PP13) Facilitates Remodeling and Structural Stabilization of Maternal Vessels during Pregnancy. *Int J Mol Sci*, 20(13).
<https://doi.org/10.3390/ijms20133192>
- Samuel, W., Jaworski, C., Postnikova, O. A., Kutty, R. K., Duncan, T., Tan, L. X., Poliakov, E., Lakkaraju, A., & Redmond, T. M. (2017). Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Mol Vis*, 23, 60-89.
- Schaub, F., Enders, P., & Fauser, S. (2016). [Proliferative Vitreoretinopathy: Therapeutic Strategies]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 233(9), 1016-1023.
<https://doi.org/10.1055/s-0042-107947> (Proliferative Vitreoretinopathie: therapeutische Strategien.)
- Schaub, F., Hoerster, R., Schiller, P., Felsch, M., Kraus, D., Zarrouk, M., Kirchhof, B., & Fauser, S. (2018). Prophylactic intravitreal 5-fluorouracil and heparin to prevent proliferative vitreoretinopathy in high-risk patients with retinal detachment: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 19(1), 384.
<https://doi.org/10.1186/s13063-018-2761-x>
- Sethi, A., Sanam, S., Alvala, R., & Alvala, M. (2021). An updated patent review of galectin-1 and galectin-3 inhibitors and their potential therapeutic applications (2016-present). *Expert Opin Ther Pat*, 31(8), 709-721.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1903430>
- Simon, J. D., Hong, L., & Peles, D. N. (2008). Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *J Phys Chem B*, 112(42), 13201-13217. <https://doi.org/10.1021/jp804248h>
- Sparrow, J. R., Hicks, D., & Hamel, C. P. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*, 10(9), 802-823.
<https://doi.org/10.2174/156652410793937813>

- Steinhorst, U. H., Chen, E. P., Hatchell, D. L., Samsa, G. P., Saloupis, P. T., Westendorf, J., & Machemer, R. (1993). Aclacinomycin A in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Efficacy and toxicity in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *34*(5), 1753-1760.
- Storm, T., Burgoyne, T., & Futter, C. E. (2020). Membrane trafficking in the retinal pigment epithelium at a glance. *J Cell Sci*, *133*(16). <https://doi.org/10.1242/jcs.238279>
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, *85*(3), 845-881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- Thijssen, 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*(43), 15975-15980. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603883103>
- Tonade, D., & Kern, T. S. (2021). Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, *83*, 100919. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100919>
- Tripathy, K., & Salini, B. (2023). Best Disease. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- Trotta, M. C., Petrillo, F., Gesualdo, C., Rossi, S., Corte, A. D., Váradi, J., Fenyvesi, F., D'Amico, M., & Hermenean, A. (2022). Effects of the Calix[4]arene Derivative Compound OTX008 on High Glucose-Stimulated ARPE-19 Cells: Focus on Galectin-1/TGF- β /EMT Pathway. *Molecules*, *27*(15). <https://doi.org/10.3390/molecules27154785>
- Valli, E., Dalotto-Moreno, T., Sterle, H. A., Méndez-Huergo, S. P., Paulazo, M. A., García, S. I., Pirola, C. J., Klecha, A. J., Rabinovich, G. A., & Cremaschi, G. A. (2023). Hypothyroidism-associated immunosuppression involves induction of galectin-1-producing regulatory T cells. *Faseb j*, *37*(4), e22865. <https://doi.org/10.1096/fj.202200884R>
- Wada, I., Sreekumar, P. G., Spee, C., MacKay, A. J., Ip, M., & Kannan, R. (2022). Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Prevention of Dispase-Induced PVR by Delivery of an Antioxidant α B Crystallin Peptide. *Antioxidants (Basel)*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/antiox11102080>
- Wallsh, J. O., & Gallemore, R. P. (2021). Anti-VEGF-Resistant Retinal Diseases: A Review of the Latest Treatment Options. *Cells*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051049>
- Wang, J., Thio, S. S., Yang, S. S., Yu, D., Yu, C. Y., Wong, Y. P., Liao, P., Li, S., & Soong, T. W. (2011). Splice variant specific modulation of CaV1.2 calcium channel by galectin-1 regulates arterial constriction. *Circ Res*, *109*(11), 1250-1258. <https://doi.org/10.1161/circresaha.111.248849>
- Wiedemann, P., & Bringmann, A. (2016). [Proliferative Vitreoretinopathy]. *Klin Monbl Augenheilkd*, *233*(9), 1012-1015. <https://doi.org/10.1055/s-0042-109704> (Die proliferative Vitreoretinopathie.)
- Wiedemann, P., Hilgers, R. D., Bauer, P., & Heimann, K. (1998). Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: results of a multicenter clinical trial. Daunomycin Study Group. *Am J Ophthalmol*, *126*(4), 550-559. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(98\)00115-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(98)00115-9)
- Wimmers, S., Karl, M. O., & Strauss, O. (2007). Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res*, *26*(3), 263-301. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.12.002>

- Wolf, G. (2003). Lipofuscin and macular degeneration. *Nutr Rev*, 61(10), 342-346. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.oct.342-346>
- 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(2), 2498-2513. <https://doi.org/10.1096/fj.201801227R>
- Wu, F., & Elliott, D. (2021). Molecular Targets for Proliferative Vitreoretinopathy. *Semin Ophthalmol*, 36(4), 218-223. <https://doi.org/10.1080/08820538.2021.1890791>
- Wu, K. Y., Mina, M., Sahyoun, J.-Y., Kalevar, A., & Tran, S. D. (2023). Retinal Prostheses: Engineering and Clinical Perspectives for Vision Restoration. *Sensors*, 23(13), 5782. <https://www.mdpi.com/1424-8220/23/13/5782>
- Wu, M. H., Chen, Y. L., Lee, K. H., Chang, C. C., Cheng, T. M., Wu, S. Y., Tu, C. C., & Tsui, W. L. (2017). Glycosylation-dependent galectin-1/neuropilin-1 interactions promote liver fibrosis through activation of TGF- β - and PDGF-like signals in hepatic stellate cells. *Sci Rep*, 7(1), 11006. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11212-1>
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 19(2), 156-172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Yang, R. Y., Rabinovich, G. A., & Liu, F. T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*, 10, e17. <https://doi.org/10.1017/s1462399408000719>
- Yang, X., Yu, X. W., Zhang, D. D., & Fan, Z. G. (2020). Blood-retinal barrier as a converging pivot in understanding the initiation and development of retinal diseases. *Chin Med J (Engl)*, 133(21), 2586-2594. <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000001015>
- You, X., Liu, Q., Wu, J., Wang, Y., Dai, J., Chen, D., Zhou, Y., & Lian, Y. (2019). Galectin-1 Promotes Vasculogenic Mimicry in Gastric Cancer by Upregulating EMT Signaling. *J Cancer*, 10(25), 6286-6297. <https://doi.org/10.7150/jca.33765>
- Young, R. W., & Bok, D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol*, 42(2), 392-403. <https://doi.org/10.1083/jcb.42.2.392>
- Żądło, A. C., & Sarna, T. (2019). Interaction of iron ions with melanin. *Acta Biochim Pol*, 66(4), 459-462. https://doi.org/10.18388/abp.2019_2889
- Zhang, P. F., Li, K. S., Shen, Y. H., Gao, P. T., Dong, Z. R., Cai, J. B., Zhang, C., Huang, X. Y., Tian, M. X., Hu, Z. Q., Gao, D. M., Fan, J., Ke, A. W., & Shi, G. M. (2016). Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis*, 7(4), e2201. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.324>
- Zhou, M., Geathers, J. S., Grillo, S. L., Weber, S. R., Wang, W., Zhao, Y., & Sundstrom, J. M. (2020). Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Dysfunction. *Front Cell Dev Biol*, 8, 501. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00501>

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Prof. Dr. Andreas Ohlmann bedanken, der mir während meiner Zeit im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich insbesondere durch seinen Glauben in meine Fähigkeiten stets motivierte.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Claudia Priglinger, die durch Ihre Pionierarbeit im Bereich der Galektine dieses Forschungsprojekt erst möglich gemacht hat.

Zudem möchte ich dem Direktor der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Professor Dr. Siegfried Priglinger, für die Möglichkeit der Forschung an seiner Einrichtung danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt zudem meinen Mitdoktoranden im Labor, welche den ein oder anderen Tag im Labor mit netten Gesprächen leichter werden ließen.

Außerdem möchte ich mich bei Katja Widholzer und Simon Paulus bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Dr. Ontje Liesenhoff und Dr. Alexandra Liesenhoff, die stets an mich glauben und mich unterstützen.