

Aus der Augenklinik und Poliklinik

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Isolation und Testung von rekombinanten Galektinen zur
Prophylaxe der proliferativen Vitreoretinopathie***

Dissertation

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

vorgelegt von

Caroline Marlene Havertz

aus

Neuss

Jahr

2024

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

Erster Gutachter: *Professor Dr. Andreas Ohlmann*

Zweiter Gutachter: *Professor Dr. Christoph Reichel*

Dritter Gutachter: *Professor Dr. Ricarda Schumann*

ggf. weitere Gutachter: _____

Dekan: *Prof. Dr. med. Thomas Gudermann*

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2024

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung	9
1.1 PVR.....	9
1.1.1 Die Netzhaut.....	9
1.1.2 Das retinale Pigmentepithel	10
1.1.3 Proliferative Vitreoretinopathie Pathogenese	11
1.1.4 PVR Therapie.....	14
1.1.5 Stand der Forschung: Neue Methoden zur Prophylaxe und Therapie der PVR.....	15
1.2 Galektin-1 und Galektin-3.....	18
1.2.1 Aufbau und Bindungsmöglichkeiten	18
1.2.2 Funktionen.....	21
1.2.3 Galektin und PVR.....	28
2. Fragestellung und Zielsetzung.....	31
3. Material und Methoden	32
3.1 Zellkultur.....	32
3.1.1 Zelllinien	32
3.1.2 Zellkulturmaterialien	33
3.1.3 Zellkulturen.....	35
3.1.4 Transfektion Galektin-1 und Galektin-3 Plasmid DNA	36
3.1.5 Selektion der Zelllinien nach Transfektion.....	38
3.1.6 Konditionierung der transfizierten EBNA-293 Zellen.....	39
3.2 Western Blot.....	39
3.2.1 Grundlagen.....	39
3.2.2 Western Blot Materialien	40
3.2.3 Lösungen und Puffer	41
3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.5 Semi-dry Protein Transfer	44
3.2.6 Immunodetektion der Proteine	44
3.2.7 Antikörper	45
3.2.8 Detektion mit Western Blot Imaging System iBrightCI1000 ...	46
3.2.9 Coomassie Brilliant- Blau Färbung.....	46
3.3 Indirekte Immunofluoreszenz der Zelllinien EBNA-HEK-293 LGALS-1 und LGALS-3.....	47

3.3.1	Materialien.....	47
3.3.2	Antikörper.....	48
3.3.3	Versuchsdurchführung Immunofluoreszenz.....	49
3.4	Testung der Bioaktivität der rekombinanten Galektine.....	50
3.4.1	Testung der Adhärenz von RPE Zellen unter dem Einfluss von Galektin-1 und Galektin-3.....	51
3.4.2	Testung der Proliferation von RPE Zellen unter dem Einfluss von Galektin-1 und Galektin-3.....	52
3.4.3	Graphische und Statistische Auswertung der Bioaktivität der rekombinanten Galektine	53
3.5	Affinitätschromatographie.....	54
3.5.1	Puffer.....	54
3.5.2	Materialien.....	54
3.5.3	Grundlagen.....	55
3.5.4	Synthese nicht konventioneller Epoxy-activated Sepahrose gekoppelt mit β -Lactose	56
3.5.5	Durchführung der Isolation von rekombinatem Galektin-1 und Galektin-3	57
	59	
3.5.6	Chromatographie durch Zentrifugation ohne Säule	59
3.6	Aufreinigung der rekombinanten Galektine aus konditioniertem Medium.....	60
3.6.1	Konzentrierung mit Hilfe der Zentrifugalkonzentratoren.....	60
3.6.2	Materialien.....	60
3.6.3	Konzentrierung von rekombinatem Galektin-1 aus konditioniertem Medium	61
3.6.4	Konzentrierung von rekombinatem Galektin-3 aus konditioniertem Medium	61
3.6.5	Zugabe von SDS und DTT zum konditionierten Medium	62
3.7	Dialyse des rekombinanten Mediums zur Proteinaufreinigung von Galektin	62
3.7.1	Grundlagen Proteindialyse	63
3.7.2	Versuchsvorbereitung	63
3.7.3	Dialyse des konditionierten Mediums, Proteinentfernung kleinerer Proteine	64
3.7.4	Dialyse des konditionierten Mediums, Proteinentfernung größerer Proteine	64
3.7.5	Aufreinigung des konzentrierten Galektin nach der Dialyse...	64
4.	Ergebnisse	66

4.1	Kontrolle der Selektion	66
4.2	Kontrolle Transfektion der EBNA-293-HEK Zellen.....	66
4.3	Immunfluoreszenz Färbung der Zelllinien EBNA HEK Gals-1 und Gals-3.....	67
4.4	Testung der Bioaktivität.....	68
4.4.1	Testung der Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 und -3 konditioniertem Medium.....	68
4.4.2	Testung der Proliferation von ARPE-19 Zellen unter Einfluss von rekombinalem Galektin-1 und Galektin-3.....	81
4.4.3	Testung der Proliferation von HUVEC Zellen unter dem Einfluss von rekombinalem Galekin-1 und Galekin-3.....	82
4.5	Affinitätschromatographie von konditioniertem Medium zur Isolation von rekombinalem Galektin-1 und -3.....	83
4.5.1	α - Lactose Agarose Beats.....	83
4.5.2	Selbst synthetisierte Epoxy-activated β -Lactose Agarose, Aminophenyl β - Lactose Agarose Beads	85
4.5.3	Variationen der Versuchsdurchführung Affinitätschromatographie zur Proteinisolation	86
4.5.4	Chromatographie durch Zentrifugation ohne Säule	88
4.6	Konzentrierung von Galektin aus konditioniertem Medium....	89
4.6.1	Konzentrierung von Galektin-1 aus konditionierten LGALS-1 Medium.....	89
4.6.2	Konzentrierung Galektin-3 aus konditionierten LGALS-3 Medium.....	91
4.7	Dialyse des konditionierten Mediums.....	93
4.7.1	Dialyse des konditionierten Mediums mit rekombinalem Galektin-1	94
4.7.2	Dialyse des konditionierten Galektin-3 Medium	95
5.	Diskussion	98
5.1	Synthese rekombinanter Galektine durch Transfektion	98
5.2	Nachweis der Bioaktivität von rekombinalem Galektin-1 und - 3 hemmen in konditioniertem Zellkulturmedium.....	99
5.2.1	Galektin und die Hemmung der Adhäsion von RPE-Zellen .	100
5.2.2	Galektin und der Einfluss auf die Proliferation	101
5.3	Isolation von rekombinanten Galektinen durch Affinitätschromatographie.....	105
5.4	Konzentrierung der Galektine im konditionierten Medium....	109
5.4.1	Konzentrierung durch Zentrifugalkonzentratoren	109
5.4.2	Konzentrierung durch Proteindialyse	110

5.5	Ausblick	112
6.	Zusammenfassung.....	114
7.	Summary	116
8.	Anhang	118
8.1	Abkürzungsverzeichnis	118
8.2	Tabellenverzeichnis.....	119
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	120
	Danksagung	124
	Affidavit	126
	Literaturverzeichnis.....	127

1. Einleitung

1.1 PVR

1.1.1 Die Netzhaut

Die Retina, eine 0,1–0,5 mm dünne, sensible Gewebsschicht, kleidet den Augapfel aus und lässt sich in zwei Teile unterteilen. Der hintere Teil des Augapfels wird durch den aus 10 Schichten bestehenden lichtempfindlichen „Pars optica retinae“ gebildet, der dem retinalen Pigmentepithel aufliegt. An der Ora serrata geht dieser Teil in den lichtunempfindlichen Teil, den „Pars caeca retina“ über (1). Die Bruchmembran ist die Grenzmembran, die das retinale Pigmentepithel und die Choroidea trennt. Direkt darüber liegt das retinale Pigmentepithel, dem die lichtsensiblen Photorezeptoren aufliegen. Die Photorezeptoren lassen sich in Stäbchen und Zapfen unterteilen. Die überwiegende Mehrzahl bildet mit circa 110 – 125 Millionen die Stäbchen, die für das Sehen in Dämmerung und während der Nacht verantwortlich sind. Das Photopigment der Stäbchen wird Rhodopsin genannt und benötigt Vitamin A zur Re- Synthese. Sie sind lichtempfindlicher als die Zapfen und befinden sich zum größten Teil parafoveal (2). Als Fovea centralis oder auch Makula lutea wird der schärfste Punkt des Sehens bezeichnet, hier befinden sich ausschließlich Zapfen. Die Anzahl der Zapfen ist mit 7 Millionen deutlich geringer. Ihre Aufgabe umfasst das Helligkeits- und Farbsehen. Es kann zwischen 3 verschiedenen Rezeptoren unterschieden werden, die entweder auf rotes, grünes oder blaues Licht sensitiv reagieren. Die Hauptfunktion der Retina ist die Umsetzung von Lichtenergie in ein Membranpotential durch die Photorezeptoren (3). Von Ihnen wird das Signal über die Bipolarenzellen zu den Ganglienzellen weitergeleitet. Die Membrana limitans stellt die innere Begrenzung der Netzhaut zum Glaskörper hin dar. Die Axone der Ganglienzellen laufen zusammen und bilden die Papille, und verlassen den Augapfel als myelinisierten Sehnerv. Ebenfalls an der Lichtverarbeitung beteiligt sind die Amakrinen- und Horizontalzellen, durch die eine horizontale Erregungsweiterleitung und damit eine erste Verarbeitung der möglich wird (4). Die Müllerzellen dienen als Stützzellen. Insgesamt sind über 55 verschiedenen Zellarten in der Netzhaut enthalten (5), mit 5 verschiedenen Klassen

an neuronalen Zellen, die zusammen ein komplexes Zellnetzwerk an Verschaltungen bilden.

1.1.2 Das retinale Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) liegt zwischen den Photorezeptoren und der Bruch-Membran und wird aus einer Schicht aus hoch pigmentierten, kubischen, polarisierten Epithelzellen gebildet (6). Stabilisiert wird das Epithel durch basolaterale Verbindungen und das individuelle Zytoskelett der einzelnen Zellen. Eine Verbindung zwischen den benachbarten Zellen wird durch tight junctions geschaffen, die eine transepitheliale Diffusion von Stoffen verhindert und hiermit die äußere Blut-Retina Schranke bildet (7).

Als Hauptfunktion des Epithels ist die Barriere- und Transportfunktion zu nennen. Es bildet eine funktionelle Einheit mit den Photorezeptoren und ist verantwortlich für ihre Funktionsfähigkeit. So verhindert es das Eindringen von größeren Molekülen aus dem Blutkreislauf in die Netzhaut (8). Die Aufgaben des RPE umfassen unter anderem die Aufnahme und Degradation verbrauchter Außensegmente der Photorezeptoren (Phagozytose), den Transport von Wasser und Nährstoffen (9), die Aufrechterhaltung der Blut- Retinaschranke, die Absorption von Streulicht und der Wärmeaustausch mit der Aderhaut (2). Weitere Aufgaben sind die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie der vascular endothelial growth factor (VEGF), die Aufrechterhaltung des Exzitationsstadiums der Photorezeptoren, sowie die Ionenzusammensetzung im subretinalen Raumes. Es konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust spezifischer Gene des Pigmentepithels zur Degradation der Photorezeptoren führt, was die Abhängigkeit der beiden Schichten verdeutlicht (10). Eine signifikante Rolle spielt das RPE auch in der Krankheitsentstehung. So ist das Epithel in die Pathogenese der PVR (11), Retinitis pigmentosa, diabetischen Retinopathie und Makula Degeneration involviert (8). Das RPE ist in der Lage, schnell auf Verletzungen zu reagieren, indem es durch eine erneute Zellteilung die Durchgängigkeit der Schicht wiederherstellt (12). So kann eine Schädigung der RPE Zellen zur Stimulation der Proliferation und Migration der Zellen führen.

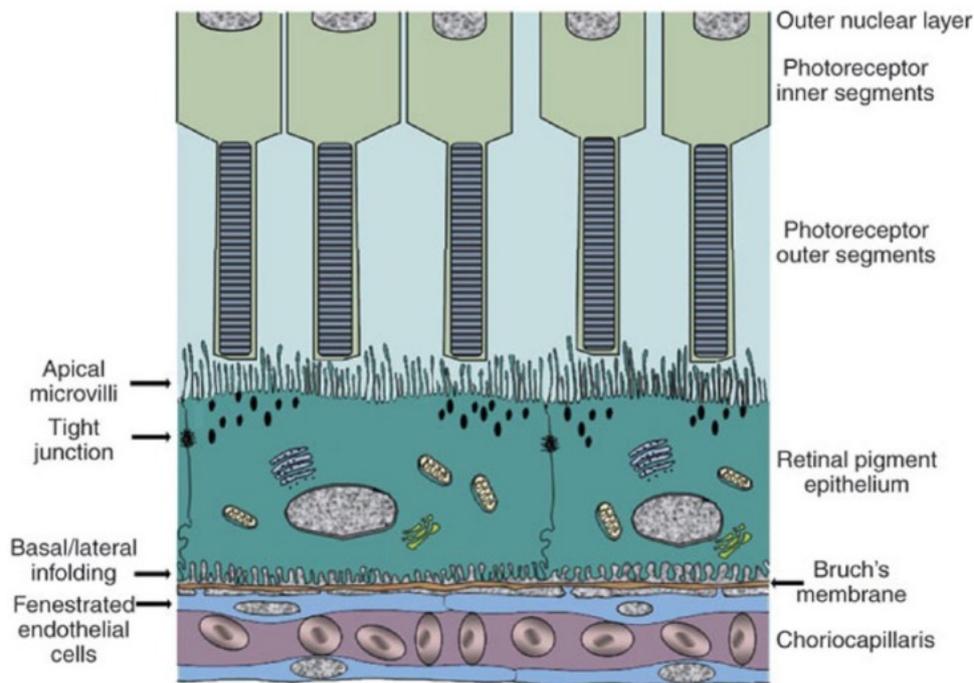


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des RPE, veröffentlicht im Journal of Tissue Engineering (8). Das RPE ist mit seiner basalen Seite zur Bruch's Membran und der apikalen Kommunikation zu den Photorezeptoren dargestellt.

1.1.3 Proliferative Vitreoretinopathie Pathogenese

Als proliferative Vitreoretinopathie (PVR) bezeichnet man eine überschießende Wundheilungsreaktion des Auges, die durch die Einwanderung von dedifferenzierten RPE-Zellen in den Glaskörper und die Entstehung von fibrozellulären Membranen gekennzeichnet ist, die durch ihre Kontraktion zu einer traktiven Netzhautablösung führen kann (13). Die PVR wird als der häufigste Grund für das Scheitern der chirurgischen Wiederanlage einer Netzhautablösung genannt (14), außerdem ist sie auch nach erfolgreicher Chirurgie der häufigste Grund einer erneuten Netzhautablösung (15). Sie ist Bestandteil von 5-10 % aller Netzhautablösungen (16). Der erste Schritt in der Pathogenese ist eine Netzhautverletzung, eine Entzündung oder altersbedingte Prozesse, wodurch retinale Pigmentepithelzellen (RPE) sowie Gliazellen und Immunzellen in der Lage sind, ihren Ursprungsort zu verlassen und in den Glaskörper einzuwandern (11, 12). Durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Cytokinen findet eine Transformation der Zellen statt, bei der sie sich in proliferative, mesenchymale Zellen verändern, durch die eine Migration an die

Oberfläche möglich wird, (17, 18). Dieser Vorgang wird als Epitheliale-mesenchymale Transformation bezeichnet (EMT). Hierbei verlieren die RPE Zellen den Kontakt zueinander und die Epithelzellen verändern sich zu Fibroblasten- und Macrophagen- ähnlichen Zellen mit mesenchymalem Charakter (12, 19). Durch diese Phänotyp Änderung verändern die Zellen ihre Eigenschaften, es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskelettes und auch die Form ändert sich (12). Infolge dessen verlieren die Zellen ihre Polarität und geordnetes Zellarrangement und sind in der Lage, in den Glaskörper einzuwandern (20).

Der Prozess der Migration von RPE Zellen ist physiologisch zur Reparatur von Wunden in der Netzhaut und des RPE's, um diese wieder zu verschließen. Bei der PVR kommt es allerdings zu einer Überproliferation von fibroblastischen mesenchymalen RPE Zellen die eine EMT durchlaufen sind (21).

Durch die Netzhautverletzung kommt es zum Zusammenbruch der Blut-Retina Schranke, was zu einer Interaktion der RPE- Zellen mit Wachstumsfaktoren und Cytokinen und zur Einwanderung von Entzündungszellen wie Macrophagen und Lymphozyten führt. Die Wachstumsfaktoren sind verantwortlich für die Produktion und den Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) (17). Eine fibrozelluläre Membran die entsteht, lässt sich in zwei Bestandteile unterteilen. Zum einen in die ECM, bestehend aus Kollagen, Laminin, Tenascin, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin. Zum anderen besteht die Membran aus Zellen der Netzhaut, bei denen vor allem Müller- Gliazellen und RPE-Zellen zu nennen sind, sowie auch Immunzellen und Fibrozyten (13). Die Zusammensetzung der jeweiligen Zellarten kann sich zwar unterscheiden, aber es ist klassischerweise immer eine Entwicklung von Zellen mit einem myofibroblastischen Zelltyp und Kollagenensynthese vorhanden (22). Durch diese neu entstandene Membran und die stetige weitere Migration von Zellen kommt es zu Kontraktion und somit einer traktiven Zugbewegung an der Netzhaut (11). Die sub- und epiretinalen Membranen können durch diese Traktion zu eine Lochbildung und Netzhautablösung führen.

Die Schritte führen zusammenfassend, über die Bildung einer Membran zu einer Netzhautablösung, welche ohne Behandlung zu einem irreversiblen Sehverlust führen würde (13).

Klinisch wurde die PVR durch die Klassifikation der Retina Society Terminology erstmals 1983 in 4 Stadien eingeteilt. Das Stadium A ist minimal, diffuse Glaskörpertrübungen sind wie ein Schleier zu erkennen. Das Stadium B ist moderat und es sind bereits retinale Aufrollungen am Rande der Netzhautlöcher zusehen, die Retina ist versteift und die Gefäße zeigen Tortuositas auf. Im Stadium C legt sich bereits die gesamte Retina in Falten. Das Stadium D beschreibt Veränderungen und Netzhautfalten in allen 4 Quadranten (16). Eine detaillierte Beschreibung des Schweregrades kann durch die Anzahl der betroffenen Quadranten getroffen werden (13).

Die Pathogenese und die involvierten Faktoren der PVR sind noch nicht vollständig geklärt, wurden aber in den letzten Jahren immer besser und genauer erforscht, um auch die Ergebnisse in der Therapie in Zukunft verbessern zu können.

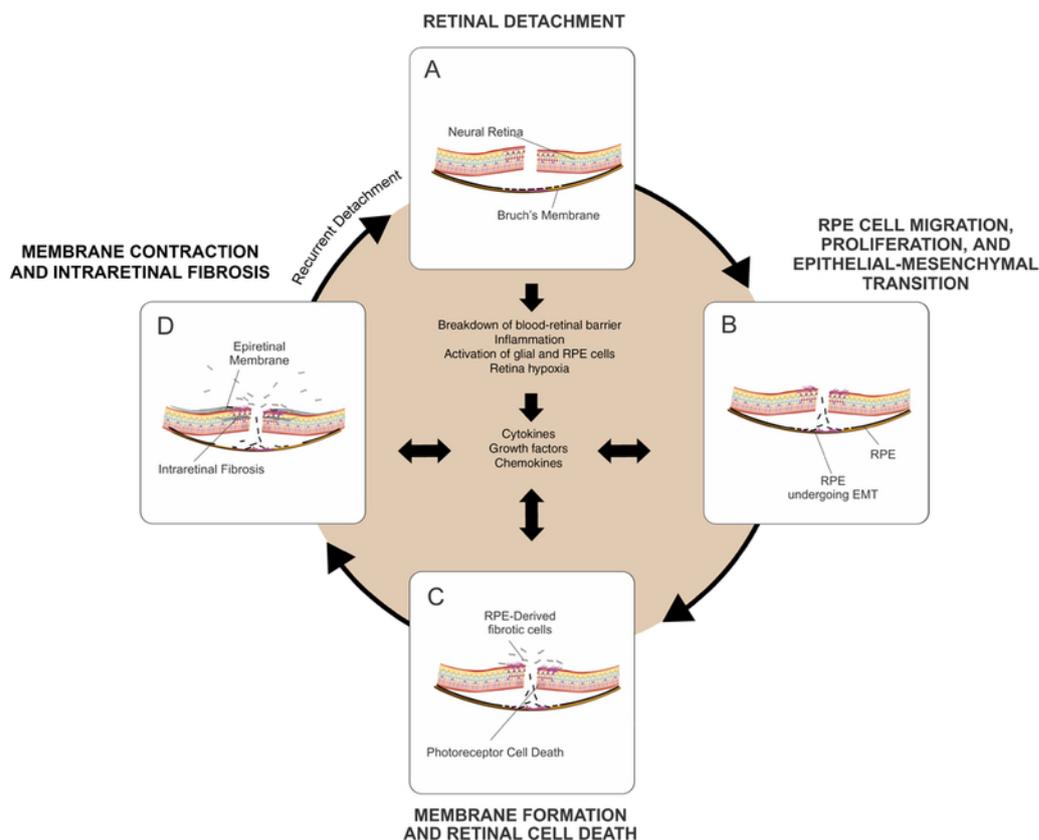


Abbildung 2: Pathogenese Schritte der PVR, veröffentlicht im Journal "International Ophthalmology Clinics" (23)

1.1.4 PVR Therapie

Das Hauptziel der chirurgischen Behandlung ist die Therapie der Netzhautablösung durch eine Wiederanlegung der Retina. Allerdings müssen auch die zusätzlich entstanden Membranen und traktiven Kräfte von der Retina entfernt werden (23). Die Ränder der entstandenen Netzhautlöcher müssen mit dem RPE vernarben und die Netzhaut durch eine Endotamponade stabilisiert werden (24). Der richtige Therapiezeitpunkt wird allerdings noch diskutiert. Es könnte sinnvoll sein, die Therapie bei einer aktiven Entzündung und PVR Stadium mit proliferierenden Zellen auf einen späteren Zeitpunkt zu verschieben, da der chirurgische Eingriff durch ihren Eingriff eine Verstärkung dieser Entzündung bewirken könnte (25). Andererseits könnte ein Therapieaufschub auch zu einem fortschreiten des Krankheitsverlaufes und somit zu einer Verstärkung des Netzhautschadens führen. Es könnte bei abwartendem Verhalten zu einer Makulabeteiligung kommen, was mit einer verstärkten Visusminderung einhergehen würde (24).

Der Goldstandard der Therapie der fibrösen Membran ist die chirurgische Entfernung des Glaskörpers sowie der traktiven Membranen (24, 26).

Das in diesem Zusammenhang genutzte Verfahren ist meistens die Pars Plana Vitrektomie oder die Buckelchirurgie. Das Ziel der Pars Plana Vitrektomie ist es, die fibrösen Membranen operativ vollständig zu entfernen (24). Bei der Buckel- oder Plombenchirurgie hingegen, wird das Loch durch ein Kunststoffmaterial von außen verschlossen (27). Eine Studie, die sich mit der Therapie von Netzhautablösungen in Folge einer Grad B oder C PVR beschäftigt, zeigt einen Vorteil der Pars Plana Vitrektomie gegenüber einer Buckelchirurgie (28). Die heutzutage meistgenutzte Methode ist die Pars Plana Vitrektomie mit einem Membranpeeling, bei der es wichtig ist, den gesamten Glaskörper sowie die traktiven Membranen vollständig zu entfernen (15, 24).

Weitere chirurgische Verfahren, die zum Einsatz kommen, sind die Retinotomie und die Retinektomie, besonders bei kompliziertem Verlauf der PVR kann der Erfolg der Therapie durch Sie vergrößert werden (29, 30). Allerdings müssen diese Verfahren mit Vorsicht angewandt werden, da Sie große chirurgische Verletzungen im Auge hinterlassen und somit eine Entzündungsreaktion und damit einhergehend auch ein Fortschreiten der PVR fördern können (24).

Eine Endotamponade ist besonders bei höher gradiger PVR zur Stabilisierung der Netzhaut verwendet und sorgt für eine Erhöhung der Netzhautwiederanlagerung. Eine Studie konnte zeigen, dass der Einsatz von Silikonöl nach Vitrektomie dem Einsatz von einer Gastamponade überlegen ist (29).

Die chirurgische Therapie allein ist allerdings nicht zufrieden stellend, da die PVR für 60-80 % der erneuten Netzhautablösungen nach Netzhautchirurgie verantwortlich ist (11). Der Behandlungserfolg ist dabei stark abhängig von der Grundverletzung die zur Entstehung der PVR beigetragen hat, sowie weiteren Faktoren wie das Stadium der PVR und die Anzahl der betroffenen Quadranten (13). Der Therapieerfolg verbessert sich, wenn die Membranen vollständig entfernt wurden (31). Trotzdem erleben 15 % der Patienten eine Visusminderung, die auf eine Makulabeteiligung zurückzuführen ist (16). Somit wäre es wünschenswert, den Therapieerfolg zum Beispiel durch eine Kombination aus chirurgischer und pharmakologischer Therapie zu verbessern oder die Entstehung der Membran durch eine pharmakologische Prophylaxe zu verzögern oder gar ganz verhindern zu können.

1.1.5 Stand der Forschung: Neue Methoden zur Prophylaxe und Therapie der PVR

Die vielzähligen Faktoren die in der Pathogenese der PVR involviert sind, sind Anstoß für die Entwicklung vieler neuer experimentelle Forschungsansätze die sich mit der pharmakologischen Hemmung der Zellmigration, Proliferation oder Inflammation befassen (11). Eine medikamentöse Option zur Prophylaxe ist aber trotzdem noch nicht bekannt und bislang konnten keine pharmakologischen getesteten Substanzen als Therapie im Einsatz gegen die PVR überzeugen (16). Besonders die vielfältigen Prozesse die betrachtet werden müssen, stellen bislang ein Hindernis dar (13). So ist es unersetzlich, über den genauen Vorgang in Kenntnis zu sein, bevor geeignete Therapiestrategien, entwickelt werden können (16). Außerdem werden immer wieder neue Erkenntnisse über die involvierten Zellen und Biomarker gewonnen (16). So sollen in Zukunft Patienten mit hohem Risiko für die Entwicklung einer PVR möglichst früh klinisch und durch spezifische Biomarker erkannt werden können (32, 33).

Ein Therapieansatz, der auf der Hemmung der Entzündung beruht, ist der experimentelle Einsatz von TNF alpha Blockern, wie zum Beispiel Infliximab (16) oder dem Immunsuppressivum Tacrolimus (34). In Tierstudien mit Meerschweinchen inklusive Kontrollgruppe konnten sich erste Erfolge zeigen (34, 35).

Auch der Einsatz von Steroiden könnte zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion führen, was durch erste Tierstudien bestätigt werden konnte (36). Eine Verträglichkeit von Dexamethason in einer Silikon-Öl Tamponade wurde bereits an Patienten getestet (37). Woraufhin randomisierte klinische Studien mit einem Dexamethasonimplantat durchgeführt wurden, die allerdings keine Verbesserung des Ergebnisses der chirurgischen Therapie zeigen konnten (38). Positive Effekte gab es ebenfalls bei Studien mit Triamcinolone, allerdings konnte dieser Effekt bei größeren randomisierten Studien mit Kontrollgruppe nicht bestätigt werden (11, 39, 40)

Es wurde der monoklonale Anti- VEGF (vascular endothelial growth factor) Antikörper Bevacizumab in einer experimentellen Studie nach Vitrektomie zur Therapie einer Grad C PVR mit Netzhautablösung in das Silikonöl gegeben und die PVR Entwicklung beobachtet. Die interventionelle Studie konnte keinen Erfolg in der Risikominimierung einer postoperativen PVR vermerken (41). Eine neue Studie die 2020 veröffentlicht wurde, hat das Prinzip der Silikonölinjektion von Bevacizumab beim gleichen Patientenkollektiv auf Methotrexat übertragen. Es konnten hierbei Unterschiede zur Kontrollgruppe beobachtet werden, allerdings waren diese nicht statistisch signifikant (42).

Der Einsatz von niedrigmolekularem Heparin kombiniert mit 5-Fluorouracil konnte bei Hochrisikopatienten einen positiven Effekt zeigen, allerdings zeigte eine andere Studie, die keine Unterscheidung im Risiko einer PVR Entwicklung beim Einschluss ihrer Probanden machte, keinen Unterschied (43). Eine randomisierte doppelt verblindete Kontrollstudie zum Einsatz dieser Medikamente wird zurzeit ausgewertet (44).

Retinolsäure konnte die Proliferation bereits in vitro und in Tiermodellen hemmen. Eine 2019 veröffentlichte Studie konnte dies durch einen Einsatz von niedrig dosiertem Isoretinoin bei Hochrisikopatienten bestätigen, allerdings sind die Nebenwirkungen noch genauer zu begutachten (45).

Antiproliferative Ansätze mit Chemotherapeutikern wie Adriamycin, Cisplatin, Etoposid, Mitomycin oder Dactomycin zeigen bislang nur in vitro gute Ergebnisse, ein Problem hierbei stellt die Retinotoxizität dar (11). Ebenfalls antiproliferativ wirkt die Alkylphosphocholine (APCs), die die Proteinkinase C hemmt und insbesondere einen Einfluss auf die Müller Zellproliferation zeigen konnte (46).

Die epitheliale mesenchymale Transition konnte in Zellkulturstudien mit retinalen Pigmentepithelzellen durch Resveratrol verringert werden. Dies konnte in vivo anhand von Kaninchenaugen bestätigt werden. Für den Einsatz am Menschen sind aber weitere Studien notwendig (47). Die Migration, Proliferation und Adhäsion wird durch Periostin gesteigert, durch die Blockierung des Proteins konnte in Tierstudien an Kaninchenaugen eine Reduzierung der PVR Membranen gezeigt werden. (48).

Ein anderer möglicher Ansatz ist die Blockierung und Neutralisierung der Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel PDGFR α (34, 49). PDGFR konnte auf der Zelloberfläche von RPE Zellen, Fibroblasten und Gliazellen nachgewiesen werden. Die PDGFR α Aktivierung ist abhängig vom vaskular endothelial growth factor (VEGF), womit beide eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PVR haben. Eine VEGF Hemmung durch Ranibizumab hat sich in Studien als effektiv gegen die PVR Entwicklung dargestellt (50). Allerdings sind dies bei weitem nicht die einzigen involvierten Wachstumsfaktoren (51). So ist TGF- β für die Transdifferenzierung und Migration der Zellen verantwortlich. Eine gentechnische Studie, die einen TGF- β -Rezeptor Vektortransfer beinhaltet, zielte auf den Gedanken an, TGF- β zu binden, bevor es seinen Zielrezeptor erreichen kann. Die Prävention des Signalweges über TGF- β könnte somit die Transdifferenzierung der RPE verhindern. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Prozess die Protein Kinase p38 in den RPE Zellen, die von TGF- β aktiviert wird. Die durch TGF- β geförderte Migration und Differenzierung der RPE-Zellen konnte durch die Inhibition der p38 mitogen aktivierte Proteinkinase gehemmt werden (24, 52, 53). Erste Erfolge konnten im Tierexperiment vermerkt werden (52).

Die Protein Kinase A ist durch die Aktivierung von TGF- β Bestandteil der PVR Pathogenese. Auch wenn die genaue Bedeutung der Protein Kinase A noch nicht

geklärt wurde, konnte eine Studie mit dem Protein Kinase Inhibitor H89 die experimentelle PVR Entstehung in vitro und in vivo abschwächen (54).

Eine Studie befasste sich mit der Erkennung spezifischer Cytokine die in die Pathogenese der PVR involviert sind, deren Blockierung könnte zu einer geringeren PVR Entwicklung führen (40). Ebenfalls getestet wurden Daunorubicin, Taxol und Cholchizin (11).

Keine dieser Substanzen konnte sich allerdings bislang als neue Therapiestrategie durchsetzen. Viele Ansätze beschränken sich bislang noch auf Konzepte, die zunächst weitere Überprüfung und Testung in Hinsicht auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit bedürfen.

1.2 Galektin-1 und Galektin-3

1.2.1 Aufbau und Bindungsmöglichkeiten

Galektine sind beta-galactoside bindende Proteine, deren Bindung an Zelloberflächen und Liganden viele regulatorische Funktionen beeinflusst. Sie befinden sich zum größten Teil intrazellulär, können aber von hier auch nach extrazellulär sekretiert werden. Sie werden dadurch charakterisiert, dass Sie über eine „Carbohydrate recognition domaine (CRD)“ spezifische Carbohydrate binden können, die die passende β -galactosidale Struktur besitzen (55). Sie werden nicht durch den klassischen Golgi-Apparat Mechanismus sezerniert, sondern auf freien Polysomen im Cytoplasma synthetisiert (56, 57). Von hier aus können sie in den Zellkern translozieren, im Cytosol verbleiben oder sezerniert werden. Im Nucleus haben sie die Möglichkeit, Teil des Spleißosomes zu werden und somit am pre-mRNA Spleißing teilzunehmen (57). Die Sekretion der Proteine findet über Vesikel Translokation direkt über die Plasmamembran statt (58). Nach der Translokation in den extrazellulären Bereich sind die Galektine in der Lage, an Zelloberflächen Gylkane zu binden und diese durch Kreuzverbindung mit Carbohydraten in der extrazellulären Matrix zu verbinden. Außerdem können Kreuzverbindungen zwischen einzelnen Gylkanen geschaffen werden, die wiederum zur Zelladhäsion führen können. Die Bindung der Galektine an Zelloberflächenmoleküle sorgt für eine Aktivierung von Signaltransduktionskasakden sowie einer Aktivierung von intrazellulären Prozessen (siehe Abbildung 2).

Galektine können in drei Subklassen anhand ihrer Carbohydratbindungsstellen eingeteilt werden. Diese Bindungsstelle besteht aus circa 130 Aminosäuren und hat die Struktur eines beta-Sandwiches ohne α - Helix (59). Die β - Faltblatt Struktur besteht aus 5 und 6 antiparallelen Blättern, die eine Einkerbung auf der konkaven Seite zur Bindung der Zuckermoleküle bildet. Die Bindungsstelle kann weiter in die Untereinheiten A-D unterteilt werden, wobei die Untereinheit C verantwortlich ist für die β -galactoside Bindung. Zusätzlich kann dann eine Bindung an den Stellen A-C je nach Subklasse der Galektine entweder zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Bindungsinteraktion führen (59). Für die Bindung der Galektine sind -OH Gruppen essenziell, im Durchschnitt sind vier -OH Gruppen für die Ligandenbindung verantwortlich. Eine wichtige Rolle spielt ebenfalls die Abspaltung des Wassermoleküls an der Bindungsstelle des Liganden, durch die erst Platz für die Bindung geschaffen wird. Eine Affinitätssteigerung findet durch die hydrophilen Eigenschaften statt, die sich die Galektine mit ihren Liganden teilen (60).

Galektin-1,-2 und 7 gehört zur Klasse der Prototypen mit einer CRD, Galektin - 4,-8,-9 und -12 zur Klasse der Tandem Repeat Galectins mit 2 CRD und Galektin 3 zur Klasse der Chemeric Galectins, mit einer CRD, die aber in Folge der Bindung in der Lage ist zu polymerisieren (61) . Die Bindungsaffinität der Galektine zu β -Galactosiden wie zum Beispiel Disacchariden und Trisacchariden ist abhängig von der Art der Präsentation des Liganden, sowie der Konzentration der Galektine. So binden die Galektine selektiver an bestimmte Zelloberflächen bei niedrigen Konzentrationen und haben bei einer höheren Konzentration ein breiteres Bindungsspektrum (57). Die Bindung der Proteine findet über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Kräfte und sowie Van-der Waal Bindungen statt (60). Die meisten der Galektine teilen die Eigenschaft, dass sie alle an beta-Galactose binden, welche sich zum Beispiel auf Glycopeptiden befindet, allerdings unterscheidet sich die Affinität der einzelnen Subklassen zu spezifischen Zellstrukturen. Alle Galektine zeigen eine starke Verbindung zu N-acetyllactosamine (LacNAc; Gal β 1,4GlcNAc), die auch als Typ 2 Saccharide bekannt sind und in N- gekoppelten als auch O- gekoppelten Glycoproteinen vorhanden sind (62). Ebenso konnte aber auch eine hohe Affinität zu Typ 1 Sacchariden, Lacto-N-biose, gezeigt werden. Die

unterschiedliche Liganden Affinität kommt durch die terminalen Verzweigungen der Bindungsstellen der Subklassen zustande (59).

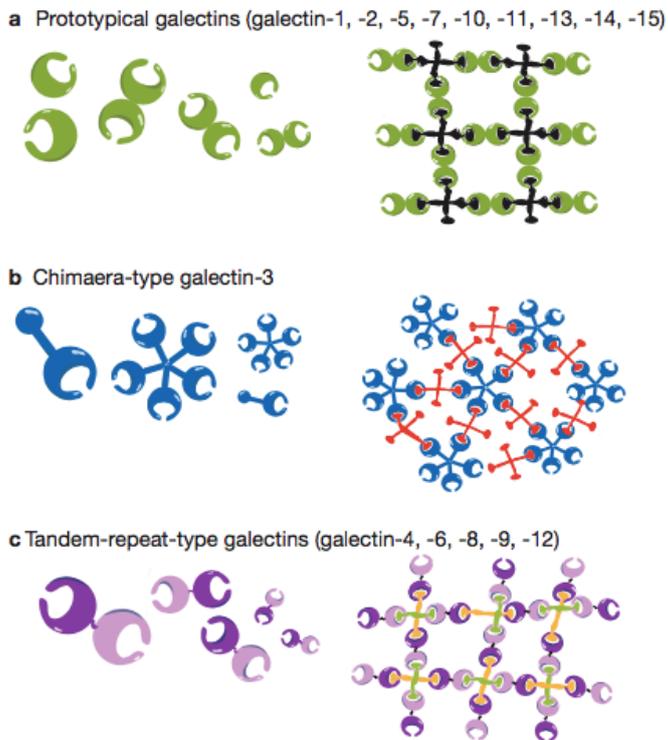


Abbildung 3: Galectin Subklassen und ihre Bindungsformation, veröffentlicht im Expert Reviews in Molecular Medicine (63)

Galectin-3 bildet an seiner Carbohydratbindungsstelle eine Spalte, die an beiden Seiten offen ist und somit eine besonders hohe Affinität für multiple Lactoseeinheiten hat (64). Zusätzlich zeigt Galectin-3 eine hohe Affinität zu modifizierten Lactoseformen wie zum Beispiel A-tetrasaccharide, diese Eigenschaft fehlt anderen Galectinen (65). Galectin-3 ist außerdem hervorzuheben, da es ohne die Anwesenheit eines Liganden eine monovalente Struktur hat, erst durch die Bindung des Liganden kann es oligomerisieren und verschiedenen Rezeptoren an seiner Oberfläche binden (60). Die Liganden für die einzelnen Subklassen sind vielzählig. So können Galectin-1 und Galectin-3 nicht nur an extrazelluläre Liganden wie Basalmembranproteine und Membranrezeptoren binden, sondern sind auch in der Lage Liganden im Cytosol und Zellkern zu binden (57, 66). Insbesondere Laminin, ein Glykoprotein verantwortlich für die Zelladhäsion, ist als Ligand für Galectin-1 und -3 zu nennen (67). Galectin-1 zeigt zudem eine besonders hohe Affinität zu den T-Zell Rezeptoren CD43, CD45 und CD7 (68).

Im Cytoplasma konnte für Galektine auch eine Carbohydrat unabhängige Liganden Bindung gezeigt werden, was die Komplexität der verschiedenen Funktionen der Galektine zeigt (66).

1.2.2 Funktionen

Durch die zahlreichen Bindungsmöglichkeiten sind Galektine in der Lage, in viele verschiedene biologische Prozesse einzugreifen. So sind sie sowohl in inter- als auch intra-zelluläre Vorgänge involviert. Dies hat sowohl einen physiologischen wie auch einen pathologischen Stellenwert. Hierbei ist der Schlüsselprozess die Erkennung und Bindung von Galektinklassen spezifischen Carbohydratstrukturen (69). Die Bindung der Galektine an ihre Liganden führt unter anderem zur Beeinflussung von zellulären Entwicklungsprozessen, die Zellsignalübertragung, die Angiogenese, das Zellmigrationsprogramm, Zelldifferenzierung, Zelltransformation sowie Entzündungsprozesse (60). Die Proteine beeinflussen die Zell-zu-Zell Kommunikation, aber auch Zell-Matrix Interaktion und die Zellfunktion selbst. Außerdem sind Galektine in der Pathogenese vieler Erkrankungen beteiligt. Hierzu zählen insbesondere Herzerkrankungen, bei denen der profibrotische und proinflammatorische Einfluss der Galektine eine Rolle spielt. So kann die Höhe von es Galektin im Plasma als prognostischer Marker dienen (54, 66, 70, 71).

Andererseits können Galektine durch ihre Proliferations- und Migrationshemmung auch bereits zu vielen therapeutischen Zwecken genutzt werden (63, 72).

In der Tumorthherapie können die Proteine als Biomarker genutzt werden, da sie vom Tumorgewebe in veränderter maligner Form vorzufinden sind. So sind zirkulierende Galektine ein prognostischer Marker insbesondere für metastasierende und proliferierende Tumore und können als Therapieansatzpunkt genutzt werden (73-75). So konnte Galektin-3C, eine verkürzte Form von Galektin-3, bereits eine Verringerung des Tumorwachstums beim multiplen Myelom (76) und eine Inhibition der Tumorangiogenese und Tumorinvasion beim Ovarialkarzinom zeigen (77). Die Inhibition von Galektin-1 konnte in vivo ebenfalls durch einen antiangiogenetischen Effekt ein vermindertes Tumorwachstum bewirken (78, 79).

Auch in COVID-19 infizierten Patienten konnten Galektine als Regulatoren des Entzündungsprozesses und der Lungenfibrose festgestellt werden und könnten zukünftig als Prognose für die Progression oder aber sogar als Therapieansatzpunkt genutzt werden (80). So konnte die Inhibition von Galektin-3 bereits eine Reduktion der Lungenfibrose nach Bleomycin Therapie zeigen (81). Intrazellulär konnte gezeigt werden, dass die Galektine am pre m-RNA splicing beteiligt sind und somit auch Einfluss auf die Genexpression, die Apoptose und den Zellzyklus nehmen können (82).

Als Schlüsselregulator der Inflammation und des Metabolismus spielen Galektine eine wichtige Rolle (62, 63). Eine Bindung der Galektine konnte für viele verschiedenen Immunzellen aufgezeigt werden, hierzu gehören aktivierte T- und B-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen, Monozyten, Macrophagen, Neutrophile und auch Eosinophile. Ob die Proteine einen pro oder anti-inflammatorischen Einfluss auf die Entzündungszellen haben, hängt von der jeweiligen Umgebung und den gebundenen Liganden ab (62).

Auch im neuronalen Netzwerk, insbesondere im olfactory bulb sind Galektine zu finden, hier spielt es besonders bei neuronaler Projektion eine Rolle (63).

Galektine spielen ebenfalls in frühen Entwicklungsstadien und der Embryogenese eine wichtige Rolle und tragen zur Zellentwicklung bei (83).

Galektine können allerdings nicht nur an endogene Rezeptoren binden, sondern auch an exogene Glykoproteine. So tragen Pathogene einen sogenannten pattern of recognition Rezeptoren (PRR), an den die Galektine binden und somit die Adhäsion und Invasion verhindern oder die direkte Phagozytose einleiten können (57). Sie wirken somit auch in der Regulierung von Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten mit. Die Proteine sind hierbei sowohl Effektor als auch Erkennungsproteine der angeborenen Immunität (64). Diese Regulierung wirkt sich negativ auf das Eindringen der Pathogene aus oder sorgt für eine schnellere Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Es konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres Galektin eher einen bakterio-statischen Effekt hat und intrazelluläres Galektin durch seine Bindung an rupturierte Endo-Lysosome der Bakterien binden kann und anschließend die Autophagie stimuliert (84). Bei Virusinfektionen wie dem HI-Virus oder dem Influenza Virus beeinflusst das Galektin die Virusbindung, die Virusreplikation, die Virus assoziierte Entzündungsreaktion und auch die

Virustransmission (84). Einige Pathogene nutzen allerdings auch die Funktion der Galektine, um sich besser an ihren Wirt anzuheften, anschließend einzudringen und sich dort zu vermehren (85).

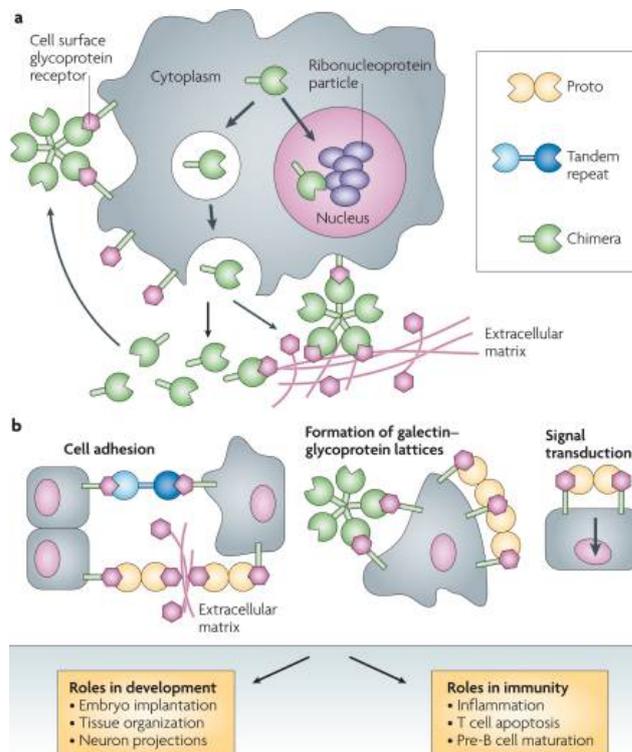


Abbildung 4: Die verschiedenen Galektin Subklassen, ihre Bindungsmöglichkeiten und ihre biologischen Aufgaben. Veröffentlicht im "nature reviews microbiology" (64)

1.2.2.1 Funktion Galektin-1

Galektin-1, ein circa 14 kDa großes Kohlenhydrat-bindendes Protein, gehört mit einer Bindungsstelle zur Subklasse der Prototypen der Galektine und kann somit Homodimere aus seinen Monomeren bilden (86).

Galektin-1 wird insbesondere von den stromalen Zellen im Thymus, von Lymphozyten, zahlreichen Immunzellen wie Macrophagen und dendritischen Zellen (87), Tumorzellen, proliferierenden Myoblasten der Muskelzellen, sowie den sensorischen olfaktorischen Neuronen sezerniert (63). Es wird durch das Gen LGALS-1 codiert.

Inflammationsmechanismen werden durch die Apoptose von aktivierten T-Zellen und die Hemmung der klonalen Expansion der Immunzellen durch die Proteine beeinflusst (62). Dadurch erhalten Sie einen anti-inflammatorischen Einfluss auf Entzündungsprozesse. Hierbei bindet Galektin-1 explizit nur aktivierte Immunzellen. Die Bindung des Proteins finden an den T-Zell

Glycoproteinen statt, hier ist vor allem CD43, CD45 und CD7 zu nennen. Insbesondere die Aktivität der T-Helferzellen und Th17 Zellen wird durch Galektin-1 supprimiert (63).

Galektin-1 ist in der Lage, die Expression von antiinflammatorischen Cytokinen zu induzieren, unter anderem IL-5, IL-10 und TGF- β , und die Synthese von inflammatorischen Proteinen wie IL-2, TNF- α und IFN- γ zu hemmen (49). Die B-Zell Aktivität wird beeinflusst, in dem Galektin-1 an die pre-B-Zell Rezeptoren bindet und sie auf diese Weise aktiviert. Allerdings wird die B-Zell Proliferation und Signaltransduktion durch die Proteine gehemmt (63). Auch Antigen-präsentierende Zellen wie Monozyten und Macrophagen werden von Galektin-1 beeinflusst, was zu einer Erhöhung der Aktivierung und Phagozytose der Zellen führt (63). Auch im Knochenmark konnte Galektin-1 beobachtet werden, hier ist seine genaue Bedeutung aber noch nicht genau geklärt. Eine Studie an haematopoetischen Stammzellen hat gezeigt, dass besonders eine hohe Dosis von Galektinen (5–10 $\mu\text{g/ml}$) zu einem antiproliferativen Effekt der Stammzellen führt (88).

Der Entzündungshemmende Effekt von Galektin-1 konnte im Tiermodell bereits für Autoimmunkrankheiten gezeigt werden (86). Hierbei konnte zum Beispiel rekombinantes Galektin-1 zu einem besseren klinischen und histopathologischen Befund bei inflammatorischen Darmerkrankungen im Mausmodell führen (89).

In weiteren Tiermodellen konnte Galektin-1 bereits durch seine inflammationshemmende Wirkung zur Therapie von Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Myasthenia Gravis, Rheumatoider Arthritis und Graft-versus-Host-disease erfolgreich eingesetzt werden (86, 90).

Des Weiteren zeigte eine Studie zur Kontaktdermatitis eine protektive Rolle der Galektine, allerdings konnte die genaue Bedeutung und der Wirkungsmechanismus noch nicht genau geklärt werden (91).

Aber nicht nur in die normalen Entzündungsprozesse, sondern auch die Tumorgenese kann Galektin-1 beeinflussen. Es konnte eine Überexpression in malignen Tumoren, wie zum Beispiel dem Osteosarcom, Brust-, Lungen-, Prostatakarzinom und dem malignen Melanom gezeigt werden (92). Insbesondere auf den Zellmigrationsprozess und die Proliferation, nimmt

Galektin-1 Einfluss. Zusammen mit Integrinen beeinflusst Galektin-1 die Tumorzelladhäsion zur extrazellulären Matrix und die Förderung der Tumormetastasierung (93). Galektin-1 kann an das onkogenetische H-RAS binden, welches durch die Aktivierung der Signalkaskade zur Tumortransformation beiträgt, (63). Galectin-1 könnte durch weitere Studien zu einer verbesserten Tumorthherapie beitragen und durch eine Hemmung als Zielansatzpunkt der Therapie dienen (94). So gibt es bereits eine Phase I Studie zum Einsatz von Galektin-1 Inhibitoren bei soliden Tumoren (75). In einem in vitro Experiment zur Therapie des Neuroblastoms, konnte ein negativ proliferativer Effekt von gereinigtem Galektin-1 auf die Zellen festgestellt werden (95). Des Weiteren gibt es einige laufende Studien mit Galektin-1 Inhibitoren zum Einsatz in der Tumorthherapie. Hier ist unter anderem eine Phase II Studie beim metastasiertem kolorektalem Karzinom (ClinicalTrials.gov: NCT00110721 and NCT00054977) und eine Phase I Studie zum Einsatz bei soliden Tumoren (ClinicalTrials.gov: NCT01724320) zu nennen.

Durch die Modulation der Signalwege die über die Rezeptoren VEGFA and TGF- β übertragen werden, nimmt Galektin-1 Einfluss auf die Angiogenese und Fibrose. Durch diese Rezeptorbindung ist das Protein an der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration beteiligt und sorgt für subretinalen Fibrose und choroidale Neovaskularisierung (96). Auch die Entstehung der diabetischen Vitreoretinopathie kann Galektin-1 durch eine reduzierte Expression des VEGF-Rezeptors beeinflussen (97).

Als Biomarker könnten Galektin-1 und -3 beim Keratokonus genutzt werden, da hier in Studien erhöhte Expressionsraten der Proteine in der Hornhaut gefunden wurden (98).

Aber auch therapeutisch kann Galektin-1 bereits am Auge eingesetzt werden. So konnte eine Studie zeigen, dass Galektin-1 haltige Augentropfen in experimentellen Ansätzen durch die Regulation der Mastzell Degranulierung und die Hemmung der Migration von Eosinophilen die allergische Konjunktivitis lindern konnte und somit einen therapeutischen Nutzen haben könnte (99, 100). Eine weitere Studie zeigte die positive anti-inflammatorische Wirkung von Galektin-1 im Tiermodell, zur Behandlung von Herpes Simplex Pathologien am Auge und führte zu einer Minderung von stromalen Hornhautläsionen (101).

Die Funktion von Galektin-1, 3 und 9 insbesondere im Zusammenhang mit der Tumor- und Immuntherapie, aber auch ihre Funktion am Auge, sowie ihre Karbohyrate- Bindungskapazitäten, wurden in den letzten Jahren noch genauer erforscht (75, 102). Auch in neusten Studien wird der Nutzen von Galektinen als Ansatzpunkt für Covid-19 Patienten diskutiert (80) und ist somit Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.2.2.2 Funktion Galektin-3

Galektin-3 ist ein 35 kDa großes Karbohydat bindendes, chimerisches Protein und wird insbesondere in Macrophagen und Epithelzellen exprimiert (57, 66, 103). Galektin-3 wird durch das Gen LGALS3 codiert und verbleibt nach seiner Synthese hauptsächlich intrazellulär im Cytoplasma. Von hier aus kann es dann entweder aktiv von Zellen sezerniert werden, wird während der Apoptose freigelassen oder transloziert in den Zellkern (103). Extrazellulär ist es besonders für die Interaktion zwischen der extrazellulären Matrix und Epithelzellen verantwortlich, während es intrazellulär die Proliferation und das Zellüberleben sowie die Apoptose beeinflusst (104). Seine Liganden kann Galektin-3 zu einen über seine CRD, die sich am C-terminalen Ende des Proteins befindet, und zum anderen über die nicht Carbohydat-spezifische flexible N-Bindungsstelle binden. Dadurch hat das Protein eine höhere Affinität zu besonders komplexen Oligosacchariden (103). Ungebunden liegt es als Monomer vor, mit 2 funktionellen Domänen, kann aber durch die Bindung eines Liganden an seinem N-Terminus oligomerisieren (105). Galectin-3 hat eine besonders hohe Affinität für Lactose (Lac) und N-acetyllactosamine (LacNAc) (106).

Schon in der frühen Embryogenese kann Galektin-3 in verschiedensten Körperzellen Zeit- und Gewebsspezifisch detektiert werden. Hierzu gehören vor allem Zellen mit epitheliale aber auch myeloidem Ursprung. So konnte Galektin-3 im Epithel der Hornhaut und Bindehaut des Auges, aber auch in anderen Organen wie dem Intestinum, Colon, Riechepithel, in der Niere, Lunge, Thymus, Brust und Prostata gefunden werden (83).

Aber auch in zahlreichen Immunzellen ist Galektin-3 vorhanden. Hierzu gehören Leukozyten, T- und aktivierte B- Lymphozyten, Mastzellen,

Langerhanszellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Macrophagen (103). Im Gegensatz zu Galektin-1 zeigt Galektin-3 eher eine proinflammatorische Wirkung, da es die Macrophagenüberlebenszeit und ihr Rekrutment positiv beeinflusst (64). Studien zeigten eine Überexpression in phagozytotisch aktiven Macrophagen. Besonders in der Zeit in der Entwicklung von Monzyten in Macrophagen (107). Galektin-3 kann intrazellulär ebenso wie Galektin-1 die Apoptose von aktivierten T-Zellen fördern (108). Während einer akuten Entzündung sorgt das Protein für die Aktivierung von Mastzellen, die Adhäsion von Neutrophilen und die Chemotaxe der Macrophagen (103).

Eine Studie konnten zeigen, dass Galektin-3 in der Wundheilung zu einer schnelleren Re- Epithelisierung von Wunden führt, indem es die Zellmigration fördert und durch seine Interaktion mit Integrinen die Formation von Tight junctions induziert (109).

Besonders oft wird Galektin-3 im Zusammenhang mit der Krebsentstehung und dessen Progression genannt. Es wurde besonders im Zusammenhang mit der Entstehung von Pankreas-, Schilddrüsen-, Nieren- und Kolonkarzinomen vermerkt (73, 106, 110, 111). In diesem Zusammenhang fördert Galektin-3 das Tumorwachstum, verstärkt die Metastasierung und unterdrückt die Immunüberwachung. Es kann in diesem Zusammenhang sowohl prognostisch als auch therapeutisch genutzt werden (112). So konnte der Einsatz von RN1, ein Galektin-3 Inhibitor, eine Minderung des Zellwachstums bei Pankreaskarzinomen in vivo und in vitro zeigen (113).

Des Weiteren steht Galektin-3 in Verbindung mit vielen verschiedenen vor allem degenerativen Krankheitsprozessen, hierzu gehören die Arteriosklerose, Herzversagen, Diabetes, Fibrosen und chronische Infektionen (103, 110). Die Rolle von Galektin-3 wurde intensiv für kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht und in diesem Zusammenhang gelten erhöhte Werte an Galektin-3 für ein prognostisch schlechteres Outcome und ist Zeichen einer Myofibrose (74, 114, 115).

Es wirkt außerdem in der Nephrogenese mit und gilt heute bei erhöhten Werten als Indikator für Fibrogenese und chronische Infektionen der Niere (104).

Auch im zentralen Nervensystem konnte Galektin-3 nachgewiesen werden, es trägt bereits zur frühen Nervenentwicklung bei und könnte auch

neurodegenerative und neuroinflammatorische Krankheiten beeinflussen (116). Auch hier konnte die Inhibition von Galektin-3 im Mausmodell therapeutisch durch die Verhinderung des Zusammenbruchs der Blut-Hirnschranke genutzt werden (117).

Auch bei verschiedenen Infektionen konnte ein erhöhter Galektin-3 Spiegel im Blut und Gewebe gezeigt werden, hierzu gehört zum Beispiel die *Helicobacter pylori* Gastritis, die Meningokokken- Meningitis, *Candida albicans* Infektion aber auch im Atemtrakt von Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (118). Da Galektin-3 von den beschädigten Zellen und Entzündungszellen direkt freigegeben wird, lässt es sich im Serum oder Urin nachweisen und könnte hier als diagnostischer Marker dienen (74).

Im Auge spielt Galektin-3 eine wichtige Barriere und Schutzfunktion und ist mitverantwortlich für den Zusammenhalt der kornealen Epithelzellen (119, 120).

Auch im Auge wurde die entzündungsfördernde Wirkung von Galektin-3 bereits untersucht. So konnte eine experimentelle Tierstudie an Affen Augen, die sich mit der Wundheilungsstörung an der Hornhaut beschäftigt, zeigen, dass das Protein durch seine Bindung an die extrazelluläre Matrix die Adhäsion und Migration von epithelialen Zellen fördert und hierdurch zu einer beschleunigten Wundheilung führen konnte (121).

Auf den besonderen Einfluss der Galektine-1 und -3 auf die RPE Zellen und die epitheliale-mesenchymale Transition soll im folgenden Teil eingegangen werden.

1.2.3 Galektin und PVR

Galektine sind beta-galactoside bindende Proteine, die sich bislang in 16 Subklassen unterteilen lassen. Durch ihre Karbohydrat- bindende Eigenschaft spielen sie eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Zellen, in der Adhäsion, Proliferation, Apoptose und der Zellsignalübertragung (55, 66).

Einen therapeutischen Nutzen könnte Galektin durch seinen negativ proliferativen und adhäsiven Effekt ebenfalls in der Therapie und Prophylaxe der proliferativen Vitreoretinopathie haben. So konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 und -3 an die RPE Zellen bindet und ihre Adhäsion und Proliferation beeinflusst (122-125). Galektine werden von den RPE- Zellen selbst endogen exprimiert und

können von hier aus wie bereits beschrieben, im nicht klassischen Sekretionsmechanismus von den Zellen sekretiert werden (122).

Eine Studie konnte an PVR Membranen die Expression von Galectin-1 mRNA in den Zellen der extrazellulären Membranen nachweisen, insbesondere in Verbindung mit Laminin, Fibronectin und Epithelzellen (123). Es konnte in der Immunhistologischen Analyse in vitro und in vivo nachgewiesen werden, dass die RPE-Zellen in der Lage sind, Galektin-1 zu synthetisieren.

Eine weitere in vitro Studie, in der retinale Pigmentepithelzellen mit Galektin-1 sowie Laminin und Lectin behandelt wurden hat gezeigt, dass Galektin-1 die Adhäsion, die Proliferation und Migration der RPE Zellen um 70 % verringern kann (125). Die Verringerung der Adhäsion kommt insbesondere zustande, in dem das Galektin die physiologischen Bindungen der RPE Zellen mit anderen Zellen inhibiert. Eine weitere Studie, die zwei Jahre später veröffentlicht wurde, wurde zur Erforschung des negativ proliferativen und adhäsiven Effektes durch Galektin-3 auf die RPE-Zellen durchgeführt, welcher bereits bei Galektin-1 erkannt wurde (126). Es konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 die Adhäsion und Ausbreitung der Zellen um 75 % verringern konnte. Experimentell konnte ermittelt werden, dass Galektin-3 die Mikrofilament Zusammensetzung der RPE-Zellen beeinflusst, was wiederum zu einer verringerten Adhäsionsmöglichkeit der Zellen geführt hat. (126).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass weder bei Galektin-1, noch Galektin-3, in einer der beiden Studien eine Zelltoxizität auch bei höheren Konzentrationen beobachtet werden konnte.

Die Charakteristiken der Glycoproteinrezeptoren an die die Galektine binden, ist noch nicht genau bestimmt (124). Es wurde in einer weiteren Studie der LMU Augenklinik München in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum festgestellt, dass Galektin-3 durch seine Bindung an die Transmembranproteine CD147 und Integrin- β 1 auf der Oberfläche der RPE-Zellen, das Clustering dieser Proteine modifiziert. Diese Transmembranproteine fördern die Synthese von extrazellulärer Matrix und spielen in der Pathogenese der PVR eine Rolle. Eine weitere Studie aus München, die sich mit der Interaktion der Galektine im Zusammenhang mit der PVR befasst, konnte multiple Proteine, vor allem Membranproteine als Bildungspartner detektieren (122). Insgesamt konnte für Galektin-3 131 und für Galektin-1 15 Bindungspartner ermittelt werden. Hierbei

beeinflusst Galektin-3 insbesondere die Zellmigration und ECM Organisation, Galektin-1 eher die Integrin-abhängigen Zellprozesse.

Insbesondere wurde eine Bindung der Galektinen an den low-density lipoprotein receptor LRP1 sowie dem platelet-derived growth factor receptor β PDGFRB gefunden und eine Clustering, die durch die Bindung der Galektine zwischen den beiden Rezeptoren geschaffen wurde (122). Diese Glykane werden insbesondere nach der EMT vermehrt exprimiert, was zu einer erhöhten Bindung der Proteine führt.

Galektin-1 und -3 interagieren durch ihre Bindung an Laminin, Fibronectin, Vitronectin und β 1 Integrin mit der extrazellulären Matrix und können dort Proliferation und Adhäsion beeinflussen (122). Insbesondere Galektin-3 konnte durch seine Bindung auf Zelloberflächen zu einer Minderung der Adhäsion der Zellen zur extrazellulären Matrix führen (127).

Trotzdem konnten noch nicht alle Interaktionswege sowie Wirkungen der Galektine insbesondere auf die RPE Zellen in Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen in Zusammenhang mit dem Fortschreiten der PVR ermittelt werden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Bindung an verschiedenste Oberflächenproteine und die daraus resultierende Signaltransduktion, die Galektine in der Lage sind, in verschiedene zelluläre Prozesse einzugreifen, die an der Pathogenese der PVR beteiligt sind.

2. Fragestellung und Zielsetzung

Die Pathogenese der PVR ist nur teilweise geklärt, auch wenn ihre Untersuchung derzeit Gegenstand verschiedenster Studien ist und war. In 5 bis 10% der Fälle wird die Netzhautablösung, ein augenchirurgischer Notfall, durch die proliferative Vitreoretinopathie (PVR) verkompliziert (23), welche normalerweise nach der chirurgischen Wiederanlegung der Netzhaut auftritt. Als inadäquate Wundheilungsreaktion ist sie die häufigste Ursache für eine erneute Netzhautablösung nach vitreoretinalen Eingriffen (13, 23). Die betroffenen Patienten benötigen oft mehrere chirurgische Eingriffe, was in der Regel mit einer deutlichen Reduktion der resultierenden Sehschärfe einhergeht (24, 128).

Als therapeutisch wirksame Prophylaxe oder Therapie könnten Galektine potenziell durch ihre anti-adhäsive, negativ migrative und antiproliferative Wirkung einsetzbar sein (123, 126, 127, 129). Galektine sind β -Galactosid-bindende Proteine, die zahlreiche Funktionen in der Signalübertragung, in der Zell-zu-Zell Kommunikationen, dem kontrollierten Zelltod und der Proliferation übernehmen.

Ziel dieser laborexperimentellen Doktorarbeit ist es, rekombinante Expression von Galektin-1 und -3 mittels eines Expressionsvektors zu über exprimieren. Nach erfolgreicher Transfektion und Detektion in HEK-293 Zellen, sollte die Expression mittels Western Blot Analyse untersucht werden. Die Bioaktivität der exprimierten Proteine wurde mittels Migrationsanalyse insbesondere auf die migrierenden retinalen Pigmentepithelzellen, getestet.

Um die Galektine auch therapeutisch nutzen zu können, müssen sie aus dem Zellkulturmedium isoliert werden oder möglichst hoch konzentriert werden.

Zusammenfassend soll gezeigt werden, dass die rekombinanten Galektine sich durch Zellkulturen synthetisieren lassen, eine Bioaktivität aufweisen und aus dem Zellkulturmedium isolierbar sind.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Medium	Zusätze
EBNA-293-HEK LGALS-1, EBNA- 293-HEK, LGALS-3 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)	Humane embryonale Nierenzellen	Dulbecco`s Modified Eagle Medium, DMEM (Biocell, Feucht, Deutschland)	+ 10 % FCS + Pen/Strep Penicillin 1000 units 5 mg Streptomycin (Sigma, 1000 ml) +25 µl G418 (InvivoGen, Toulouse France) +40 µl Hygromycin B (Santa Cruz, Dallas, Texas)
EBNA- 293 HEK (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM HAM's F12 (Biocell, Feucht, Deutschland)	+ 10 % FCS + Pen/Strep: Penicillin 1000 units 5 mg Streptomycin (Sigma, 1000 ml)

			+25 µl G418 (InvivoGen, Toulouse France)
A-RPE 19 (ATCC, Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten)	Humane retinale Pigmentepithelzellen	DMEM HAM's F12 (Biocell, Feucht, Deutschland)	+ 10 % FCS + Pen/Strep: Penicillin 1000 units 5 mg Streptomycin (Sigma, 1000 ml)
Huvec (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA)	Human umbilical vein endothelial cells	Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland)	+ 2 % Pen/Strep

3.1.2 Zellkulturmaterialien

Tabelle 2: Zellkulturgeräte

Produkt	Firma	Firmensitz
Elektronische Pipette Easypet	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Hochgeschwindigkeitszentrifuge 5810 R	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Inkubator	Hera Cell 150, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

Phasen-Kontrast-Mikroskop DFC 295	Leica Microsystems	Solms, Deutschland
Reference® 2 Fixed Volume Pipettor 2 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Eppendorf SE	Hamburg Deutschland
Sicherheitswerkbank, HeraSafe	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Wärmewasserbad	Memmert GmbH	Büchenbach, Deutschland

Tabelle 3: Zellkulturmaterialien

Produkt	Firma	Firmensitz
10 % New born calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Penicillin- Streptomycin 10000U Penicillin, 10mg Streptomycin, P4333- 100ML	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Gibco Versene 1:5000 + 2.5 % Trypsin 100ml, 15090-046	Life technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D8537- 500ML	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ultra Pure Water, L0015, 500ml	Biochrom GmbH	Cambridge, UK

Zellkulturflasche (TC-Flasche T25, 83.3910.002)	Sarstedt AG und Co. Kg	Nürmbrecht, Deutschland
Zelltube 15ml, 62.554.502	Sarstedt AG und Co. Kg	Nürmbrecht, Deutschland
Zelltube 50ml, 227 261	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Zentrifugationsgefäß	Star Lab	Hamburg, Deutschland
Hygromycin	Santa Cruz	Dallas, Texas
Neomycin G418	Invivo Gen	San Diego, Kalifornien
5 und 10 ml serologische Pipette	Sarstedt	Nürmbrecht, Deutschland
Glaspipetten, Glass Pasteur Pipettes, 225mm	Brand GmbH	Anröchte, Deutschland
6 und 96 Well Cell Culture Platte	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Neubauerzählkammer	Marienfeld Superior	Lauda Königshofen, Deutschland
Deckgläser 12mm	Karl Hecht GmbH	Sondheim, Deutschland

3.1.3 Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank behandelt. Die verwendeten Materialien waren steril. Die Inkubation erfolgte im Inkubator in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre und 5% Penicillin und Streptomycin zur Versorgung mit Nährstoffen versetzt und alle zwei Tage gewechselt. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Zur Kontrolle der Zelldichte wurden die Zellen regelmäßig unter dem Phasen-Kontrast Mikroskop inspiziert. Bei zu starker Konfluenz in der Zellkulturflasche

wurden die Zellen mit Hilfe von Versene Solution und 2,5 % Trypsin abgelöst und anschließend in neue Zellkulturflaschen ausgeteilt.

Die Zellen wurden für verschieden Versuchsreihen mit Hilfe der Neubauerzählkammer ausgezählt. Hierbei wurde die Anzahl der Zellen in den 4 Quadranten gezählt und der Mittelwert ermittelt (vergleiche Abbildung 5).

Zur Vorbereitung auf die Immunfluoreszenz wurden die Zelllinien EBNA HEK-293, EBNA-HEK-293 LGals-1 und EBNA HEK-293 Gals-3 auf einer 6 Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Je Well befinden sich 4 Glasplättchen. Sobald die Zellen angewachsen waren und eine Konfluenz von circa 50 % erreicht hatten, wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen dreimal mit dem Phosphatpuffer gewaschen. Zur Fixierung wurde eine 4 % Paraformaldehyd Lösung für 5 Minuten hinzugegeben.

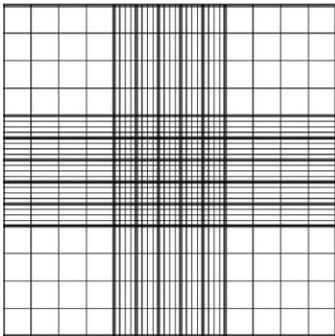


Abbildung 5: Neubauer Zählkammer, Raster Veröffentlicht auf ZaehlKammer.de(130)

3.1.4 Transfektion Galektin-1 und Galektin-3 Plasmid DNA

3.1.4.1 Materialien

Tabelle 4: Materialien Plasmid Transfektion

Produkt	Firma	Firmensitz
Zellkultur EBNA-293 HEK	Thermofisher	Waltham, Massachusetts, USA
Lipofectamine™ 3000 Reagent	Thermofisher, Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA Darmstadt, Deutschland

P 3000 Reagent	ThermoFisher, Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA Darmstadt, Deutschland
Galectin-1 cDNA ORF Clone, Human, untagged	SinoBiological	Hauptsitz: Beijing, China Verteiler in Deutschland: Biozol, Eching
Galectin 3/LGALS3 cDNA ORF Clone, Human, untagged	SinoBiological	Hauptsitz: Beijing, China Verteiler in Deutschland: Biozol, Eching
DMEM/HAM's F12 Medium, ohne Zusätze	Bio&Sell	Feucht bei Nürnberg, Deutschland

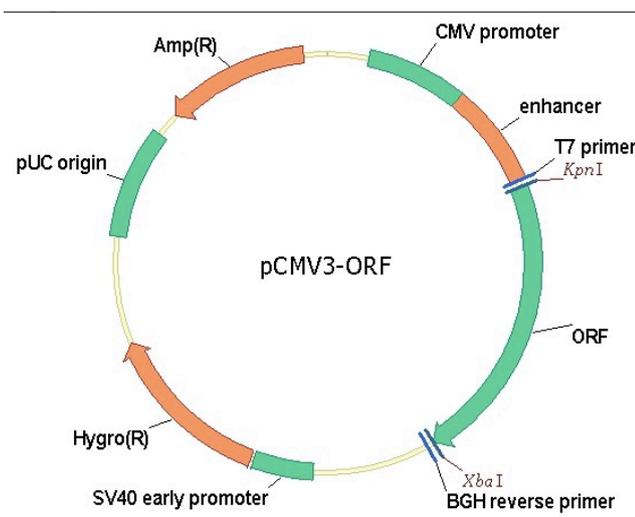


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pCMV3-LGALS3, dass LGALS3 unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert. Zusätzlich enthält der Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin und Hygromycin zur Selektion von transformierten *E.coli* und eukaryonten Zellen, veröffentlicht auf der Website des Herstellers Sinobiological (131)

3.1.4.2 Transfektion Durchführung

Zur Transfektion wurden Zellen der Linie EBNA-293 HEK mit einer Konfluenz von 70-90 % verwendet.

Zur Transfektion der Galectin-1 und Galectin-3 Plasmide wurden insgesamt vier verschiedene Ansätze gewählt. Hierfür wurde 0,75 bzw. 1,5 µl Lipofectamin™

3000 zunächst in 50 µl DMEM HAMs F12 Medium gegeben und mit Hilfe des Vortex Gerätes für 2-3 Sekunden gemischt. Im nächsten Schritt wurde 1 bzw. 2 µg DNA sowie 2 bzw. 4 µl P3000™ Reagens in 50 µl DMEM Ham's F12 Medium gegeben. Anschließend wurden 50µl des DNA-Ansatzes sowie 50µl des Lipofectamine™3000 Ansatzes in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde das Gemisch aus DNA und Lipid zu den Zellen, die in einer 24-Wellplatte kultiviert waren, gegeben. Nach einer Inkubation von 2h bei 37°C erfolgte ein Mediumwechsel mit supplementiertem DMEM Ham's F12 Medium.

Die 4 Ansätze unterschieden sich wie folgt und wurden einmal mit dem Plasmid zur Expression von Galektin-1 sowie von Galektin-3 durchgeführt.

1. 1 µg Plasmid + 0,75 µl Lipofectin 3000 + 2 µl P3000 Reagens
2. 1 µg Plasmid + 1,5 µl Lipofectin 3000 + 2 µl P3000 Reagens
3. 2 µg Plasmid + 0,75 µl Lipofectin 3000 + 4 µl P3000 Reagens
4. 2 µg Plasmid + 1,5 µl Lipofectin 3000 + 4 µl P3000 Reagens

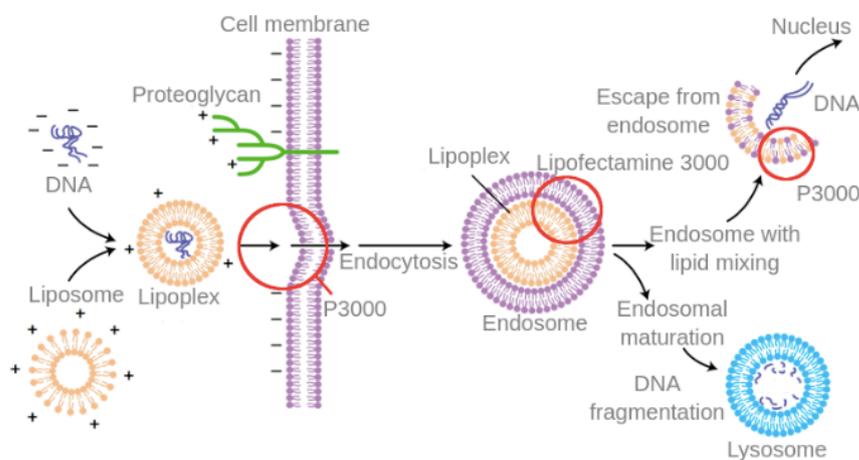


Abbildung 7: Der Molekularmechanismus des Lipofectamin 3000, veröffentlicht in Expert Review in Molecular Medicine 2003 Cambridge University (132)

3.1.5 Selektion der Zelllinien nach Transfektion

Nach Durchführung der Transfektion der Zelllinie EBNA-293 HEK war es notwendig, die Zellen heraus zu selektieren, die die Plasmid DNA für die Produktion von Galektin-1 und Galektin-3 erfolgreich eingebaut haben. Dies gelang durch die Zugabe von 200 µg/ml Hygromycin (Santa Cruz) für 2 Wochen.

Das eingebaute Plasmid enthält ein Hygromycin- Resistenzgen (siehe Abbildung 5), wodurch es den transfektierten Zellen gelingt, diese Selektion zu überleben.

Zur Kontrolle der Expression von Galektin-1 und Galektin-3 wurden Überstände aus dem Medium entnommen und auf einen Western Blot aufgetragen.

3.1.6 Konditionierung der transfizierten EBNA-293 Zellen

Die Zelllinien EBNA-293 HEK_LGALS1 und LGALS3 wurden zunächst in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, um Reste von fetalem Kälberserum (FCS) zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 3 Tage ohne FCS und Antibiotika in DMEM HAM'S F12 Medium im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde im nächsten Schritt gesammelt und bei 5000 G zentrifugiert und der Überstand entfernt. Bis zur Testung auf die Expression von Galektin-1 und Galektin-3 wurde es bei 4 Grad in einem sterilen Gefäß in der Kühlkammer gelagert.

3.2 Western Blot

3.2.1 Grundlagen

Das Western Blot Verfahren dient der Darstellung von Proteinen und der Quantifizierung ihrer Menge. Hierzu wurden die Proteine im ersten Schritt mit Hilfe der Gelelektrophorese nach ihrer Größe durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld aufgetrennt. SDS sorgt für eine Auflösung der tertiären und quartären Struktur. Das SDS lagert sich so an die Proteine an, dass sie anschließend gleichmäßig negativ geladen sind. Neben SDS enthält der Ladungspuffer Dithiothreitol (DTT) welches zur Aufspaltung der Schwefelbrücken genutzt wird. Im zweiten Schritt wurden die Proteine mit der Blotting-Kammer auf eine PVDF Membran übertragen und anschließend auf der Membran mit spezifischen primären und sekundären Antikörpern inkubiert. Durch Substratumsetzung spezifisch gekoppelter Enzyme und die daraus resultierenden Lichtemissionen konnten die Zielproteine mit Hilfe eines Imaging Systems in Form von Banden detektiert werden.

3.2.2 Western Blot Materialien

Tabelle 5: Western Blot Labormaterialien

Produkt	Firma	Firmensitz
Blotting Kammer, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad	Hercules, Kalifornien
Blotting Paper	GE Healthcare Life Science	Chalfont St Giles, Großbritannien
Eppendorf Gefäß, Safe Lock Tubes 1,5ml, 2ml	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Gelelektrophorese, Mini PROTEAN 3 System	Bio Rad	Hercules, Kalifornien
Glasplatten, Spacer Plates 1653310	Bio Rad	Hercules, Kalifornien
Glasplatten, Short Plates 1653308	Bio Rad	Hercules, Kalifornien
Magnetrührer, C-MAG HS 7	IKA	Staufen im Breisgau, Deutschland
Milli-Q EQ 7000 ultrapure water purification system	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ph Meter, pH 526 MultiCal	WTW	Weilheim, Deutschland
Power Pac 200	Bio Rad	Hercules, Kalifornien
PVDF Western Blotting Membranes, 03010040001	Roche	Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Roller Mixer, SRT6	Stuart	Staffordshire, UK
Schüttler	Edmund Bühler	Tübingen, Deutschland

Thermomixer comfort	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, New York
Wage Explorer E00640 Scout Pro 600g	Ohaus	Parsippany, New Jersey, USA
Western Blot Reader, iBright CL1000	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Zelltube 50ml, 227 261	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Zentrifuge, Zentrifuge 5417 R	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, Zentrifuge 5424	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, Combi-Spin	Biosan	Riga, Lettland

3.2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungen für die SDS-PAGE

Lösungen	Zusammensetzung
Trenngel 10 %	H ₂ O 4 ml
	30 % acrylamid mix 3.3 ml
	1.5 M Tris- HCL ph 8.8 2.5 ml
	10 % SDS 0.1 ml
	10 % ammonium persulfate 0.1 ml
	Temed 0.004 ml

Trenngel 15 %	H ₂ O	2.3 ml
	30 % acrylamid mix	5.0 ml
	1.5 M Tris-HCl ph 8.8	2.5 ml
	10 % SDS	0.1 ml
	10 % ammonium persulfate	0.1ml
	Temed	0.004 ml
Sammelgel 5 % für Polyacrylamid gel	H ₂ O	3.4 ml
	30 % acrylamide mix	0.83 ml
	1.0 M Tris ph 6.8	0.63 ml
	10 % SDS	0.05 ml
	10 % ammonium persulfate	0.05 ml
	Temed	0.005 ml
Ladungs Puffer	200 mM Tris-HCl ph 6.8	
	8 % SDS	
	0.4 % Bromophenolblau	
	40 % Glycerol	
	2M Dithiothreitol	

Tabelle 7: Lösungen und Waschpuffer

Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	48 mM Tris Base (Roth) 39 mM Glycine (Roth) 0.037 % SDS 20 % Methanol
5x Elektrodenpuffer	48 mM Tris Base 39 mM Glycine 0.1 % SDS

Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Maleic acid	0.1M Maleic Acid 0.15M Natrium Chlorid 0.3 % Tween
Detektions Puffer	0.1 M Tris- HCl 0.1 M Natriumchlorid

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

In diesem Schritt wurden die Proteine mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und dem Thermomixer denaturiert. Nach Anreicherung mit dem Ladungspuffer (vergleiche **Tabelle 6**), wurden die Proben für 5 Minuten bei 99°C erhitzt. Um die Renaturierung zu verhindern, müssen die Proben nach Erhitzen auf Eis gekühlt werden.

Vor der Gelelektrophorese wurden zunächst zwei verschiedene Gele hergestellt (vergleiche Tabelle **Tabelle 6**). Hierfür mussten die Glasplatten zunächst mit Methanol gereinigt werden. Anschließend wurden je eine kleine und eine große Glasplatte zusammen aufgespannt, um zwischen ihnen das Gel herzustellen. Es wurde zunächst ein 5% Sammelgel und anschließend nach Aushärtung, darüber entweder ein 10% Trenngel für die Proben des konditionierten Mediums mit Galektin-3 oder ein 15% Trenngel für die Proben des konditionierten Mediums mit Galektin-1 Proteine, hergestellt (siehe **Tabelle 6**). Vor Aushärtung des Geles wurden Kämme zur Formung der Taschen eingesetzt.

Zur Gelelektrophorese wurden die Polyacrylamidgele in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammern wurden mit Elektrodenpuffer aufgefüllt, die Kämme aus den Gelen entfernt und die einzelnen Kammern mit den vorbereiteten Proben aufgefüllt. Die Kammer wurde anschließend mit einem Deckel verschlossen. Zum Einlaufen der Proben durch das Sammelgel wurde

eine Spannung von 80 Volt über 20 Minuten angelegt. Sobald die Proben in das Sammelgel gewandert sind, wird die Spannung auf 180 Volt erhöht und für circa 40 Minuten angelegt, bis die Proben mit dem Ladungspuffer vollständig durch das Gel gelaufen sind. Die negativ geladenen Proteine wurden bei diesem Vorgang ladungsabhängig durch das senkrecht ausgerichtete elektromagnetische Feld nach ihrer Größe aus dem Gemisch aufgetrennt und wanderten unterschiedlich weit zur positiv geladenen Anode (133). Kleinere Proteine wandern weniger weit durch die Matrix.

3.2.5 Semi-dry Protein Transfer

Zum weiteren Nachweis wurden die Proteine nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert. Dieser Schritt ist nötig, um die Proteine für weitere Detektion zugänglich zu machen, da das Gel zu instabil ist. Die Membran ist stark hydrophob, weshalb sie vor dem Proteintransfer in 100 % Methanol getränkt werden muss, um den Transfer der Proteine zu ermöglichen. Anschließend wurde die Membran und 5 Filterpapiere mit einem Transferpuffer behandelt, um das Schwellen des Gels zu verhindern (134). Die Elektrophoresekammer wurde geöffnet und die Gele entnommen. Es wird zunächst vorsichtig das Trenngel vom Sammelgel abgelöst und verworfen. Die getränkte PVDF-Membran wurde auf das Gel gelegt und festgedrückt. Ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier wurde auf das Gel gelegt und mit Hilfe von Skalpell und Pinzette wird der Stapel vorsichtig von der Glasplatte abgelöst. Für den Proteintransfer wurde der Stapel mit einem weiteren Filterpapier auf der Seite der Membran und mit drei Filterpapieren auf der Seite des Gels erweitert. Der Stapel wurde in die Semi-dry Blotting Kammer zwischen Katode und Anode gelegt, die Kammer geschlossen und eine Stromspannung von 25 Volt für 75 Minuten angelegt. Die Proteine wurden in diesem Schritt im selben Muster wie im Gel auf die Membran übertragen und auf dieser gebunden.

3.2.6 Immunodetektion der Proteine

Nach Blotten der Proteine auf die PVDF Membran, musste diese dreimal mit PBS equilibriert werden. Bevor die Proteine mit primärem und sekundärem Antikörper detektiert werden konnten, musste eine unspezifische Bindung der Antikörper durch eine Blockierung unterbunden werden. Die freien Stellen, die für den

Antikörper nicht spezifischen Proteine, wurden mit einer 3 % Magermilchlösung blockiert (vergleiche **Tabelle 8**). Der primäre Antikörper wurde eins zu tausend verdünnt und in 10 ml einer eins zu zehn verdünnten Blockierungslösung (siehe Tabelle 7) gegeben und anschließend über Nacht mit der Membran bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper erkennt den primären Antikörper und ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, die durch die Substratumsetzung ein Präzipitat zeigt.

3.2.7 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper Western Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslösung
Primärer AK Anti-GAL-1 rabbit	Abcam/ab 108389 (Cambridge, England)	1:1000	3 % Magermilchpulver + 0.1 % Tween
Sekundärer AK GAL-1 alkalische Phosphatase konjugierter Anti- rabbit	DIANOVA (Hamburg, Deutschland)	1:1000	3 % Magermilchpulver + 0.1 % Tween
Primärer AK Anti-Gal-3 rat	Santa Cruz/sc- 23938 (Kalifornien, USA)	1:1000	3% Magermilchpulver + 0.1 % Tween
Sekundäre AK GAL-3 alkalische Phosphatase konjugierter Anti- rat	NOVEX/A18736 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts)	1:1000	3% Magermilchpulver + 0.1 % Tween

--	--	--	--

3.2.8 Detektion mit Western Blot Imaging System iBrightCI1000

Nach Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran dreimal mit dem Waschpuffer Maleic acid gewaschen, um ungebundene sekundäre Antikörper zu entfernen. Um den sekundären Antikörper sichtbar zu machen, wird CDP-Star (Tropix CDP-Star with Nitro Block II, Applied Biosystems USA) für fünf Minuten auf die Membran gegeben. CDP-Star wird von der alkalischen Phosphatase als Chemilumineszenz Substrat genutzt. Die daraus resultierenden Lichtemissionen konnte vom iBrightCI1000 sensitiv detektiert werden und somit Rückschlüsse auf das Vorhandensein von alkalischer Phosphatase markierter Moleküle gezogen werden. Bei positiver Detektion eines Signals erscheint eine schwarze Bande im End Bild.

3.2.9 Coomassie Brilliant- Blau Färbung

Tabelle 9: Coomassie Blau Färbung

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	50 % Methanol 10 % glacial acetic acid
Färbungslösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 50 % methanol 10 % glacial acetic acid
Entfärbungslösung	40 % Methanol 10 % glacial acetic acid

Nach Anreicherung der Proteine ist es möglich, die Proteinbanden mit Hilfe von Coomassie brilliant blue R-250 sichtbar zu machen. Dazu wurde die Membran für 30 Minuten in eine Fixiersubstanz gegeben, da die Coomassiesubstanz ein saures Milieu benötigt, um Proteine zu binden. Anschließend kann die Membran durch eine 20-minütige Inkubation in der Färbungslösung gefärbt werden.

Überschüssige Farbe die nicht die Banden, sondern den Hintergrund anfärbt, konnte durch die Entfärbungslösung entfernt werden. Die Entfärbungslösung konnte mehrmals angewandt werden, bis sich ein klares Bild ergab.

3.3 Indirekte Immunfluoreszenz der Zelllinien EBNA-HEK-293 LGALS-1 und LGALS-3

3.3.1 Materialien

Tabelle 10: Materialien Zellfärbung

Produkt	Hersteller/ Zusammensetzung	Firmensitz/ Niederlassung
Phosphatpuffer	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA) 4%	40 g Paraformaldehyde (Sigma Aldrich) 200 µl NaOH 1000 ml aqua dest 25 ml PBS	Steinheim, Deutschland
Waschpuffer 0.1 M Phosphatpuffer ph 7.4	137 mM Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat	

Blockierungspuffer: 0.1 % Triton X 3 % BSA	Carl Roth Sigmaaldrich	Karlsruhe, Deutschland Taufkirchen, Deutschland
6 Well Platte 6 Well Cell Culture Plate, 657 160	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Österreich
Bemist tm Parafilm tm M Labotratory Wrapping Film	Thermo fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Hoechst 33342 verdünnt in 0.1 M Phosphatpuffer	Invitrogen by Thermofisher	Waltham, Massachusetts, USA
Mounting Medium	Vector Laboratories	Burlingame, Californien
Mikroskop Zeiss Blue 3.0, Axio Observer Focus Controller. 2 ApoTome. 2 SMC 2009 Power Supply 232	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Kamera Axiocam 506 mono	Zeiss	Oberkochen, Deutschland

3.3.2 Antikörper

Tabelle 11: Antikörper Zellfärbung

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslösung
Primärer AK Anti Gal-1 rabbit	Abcam/ab 108389 (Cambridge, England)	1:50	3% BSA, 0.1 % Tween 1:10 verdünnt in PBS
Sekundärer AK Alexa Fluor™ IgG Plus 488 Goat anti rabbit	Invitrogen by Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	1:500	3 % BSA, 0.1 % Tween 1:10 verdünnt in PBS
Primärer AK Anti Gal-3 rat	Santa Cruz/sc- 23938 (Kalifornien, USA)	1:50	3% BSA, 0.1 % Tween 1:10 verdünnt in PBS
Sekundärer AK Alexa Fluor IgG Plus 488 Monkey anti rat	Invitrogen by Thermo Fisher (Carlsbad, Californien USA)	1:500	3 % BSA, 0.1 % Tween 1:10 verdünnt in PBS

3.3.3 Versuchsdurchführung Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenz wurde durchgeführt, um das rekombinante exprimierte Galektin-1 und Galektin-3 im konditionierten Medium zu detektieren und zu visualisieren. Um dies möglich zu machen, wurden proteinspezifische Antikörper verwendet. Nach Inkubation eines primären Antikörpers wurde ein gegen die Spezies passender sekundärer Antikörper verwendet (vergleiche Tabelle 11), welcher an einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorchrom) gekoppelt ist. Die Farbmarkierung konnte durch spezifische Exzitationswellen angeregt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop (vergleiche Tabelle 10) sichtbar gemacht werden. Die hier verwendeten Antikörper imitieren Licht durch eine Anregungsquelle mit einer Wellenlänge von 488 nm aus. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte EBNA-HEK-293 Zellen verwendet.

Die fixierten Zellen (vergleiche Kapitel Zellkulturen) der Zelllinien EBNA HEK-293, EBNA-HEK-293 LGals-1 und EBNA HEK-293 Gals-3 wurden nun zur weiteren Versuchsdurchführung verwendet. Es wurden auf Glasplättchen fixierte Zellen mit einer Pinzette entnommen und auf eine mit Parafilm bespannte Platte gelegt. Diese Plättchen wurden dreimal für 5 Minuten mit Waschpuffer (0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4) equilibriert. Anschließend wurde der Blockierungspuffer, bestehend aus 3 % BSA und 0,1 % Triton X (vergleiche Tabelle 10), für 30 Minuten hinzugegeben, um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren und eine unspezifische Bindung zu vermeiden. Nach der Blockierung wurden 100 µl des 1:50 verdünnten primären Antikörpers auf Plättchen der je passenden Zellkultur gegeben, das andere Plättchen diente als Kontrolle und wurde ohne Antikörper belassen. Der Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Blockierungslösung entfernt und die Plättchen erneut dreimal für 5 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper hinzugegeben wurde. Es wurde 100 µl des 1:500 verdünnten sekundären Antikörpers für 1 Stunde auf die Plättchen gegeben und unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Die Antikörper-Blockierungslösung wurde wieder entfernt und die Plättchen dreimal mit dem Waschpuffer je 5 min gewaschen. Anschließend wurde die DNA des Zellkerns mit dem membranpermeablen 1:2000 verdünnten Hoechst 33342 markiert. Hierfür wurden die Plättchen für 5 Minuten mit Hoechst behandelt. Danach wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen. Es wird für die 3 verschiedenen Zellarten je ein Objektträger vorbereitet, auf dem ein Tropfen des Mounting Mediums gegeben wurde (vergleiche Tabelle 10). Das Mounting Medium schützt die Zellen vor der Austrocknung und macht eine Langzeitaufbewahrung möglich. Es optimiert außerdem den Brechungsindex durch das Glas (135). Nachdem der Objektträger getrocknet war, konnte die Fluoreszenz der rekombinanten Galektine mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und fotodokumentiert gemacht werden.

3.4 Testung der Bioaktivität der rekombinanten Galektine

Da die rekombinanten Galektin-1 und Galektin-3 einen potenziell therapeutischen Nutzen zum Beispiel zur Therapie der PVR haben könnten, wurde zunächst ihre Bioaktivität getestet. Hierfür wurden retinale

Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) und mikrovaskuläre Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC Zellen) verwendet (vergleiche **Tabelle 1: Zelllinien**). Die kultivierten Zellen wurden hierfür mit rekombinanten Galektin aus konditioniertem Medium behandelt und auf Proliferation sowie Adhäsion getestet. Beobachtet wurde neben der Bioaktivität auch das toxische Potential der Galektine auf die Vitalität der Zellen.

3.4.1 Testung der Adhärenz von RPE Zellen unter dem Einfluss von Galektin-1 und Galektin-3

Zur Testung des Adhäsionsverhalten der retinalen Pigmentepithelzellen Zellen unter dem Einfluss von rekombinanten Galektin-1 und Galektin-3, wurden kultivierte ARPE-19 Zellen trypsinisiert und auf einer 6-Well Platte in 2 ml konditioniertem Medium ausgesät. Das konditionierte Medium wurde zum einen unverdünnt oder in einer Verdünnung mit DMEM Ham's F12 Medium von 1:1 verwendet.

Die Belegung der Wells war wie folgend:

1. Well: 1 ml konditioniertes Medium nicht transfizierter EBNA Zellen
+ 1ml DMEM Ham's F12 Medium
2. Well: 2 ml konditioniertes Medium nicht transfizierter Zellen
3. Well: 1 ml mit rekombinanten Galektin-1 konditioniertem Medium
+ 1 ml DMEM Ham's F12 Medium
4. Well: 2 ml mit rekombinanten Galektin-1 konditioniertem Medium
5. Well: 1 ml mit rekombinanten Galektin-3 konditioniertem Medium
+ 1 ml DMEM Ham's F12 Medium
6. Well: 2 ml mit rekombinanten Galektin-3 konditioniertem Medium

Well 1 und 2 wurden als Kontrollen verwendet, da sich hier kein rekombinantes Galektin im konditionierten Medium befand, es aber ausgeschlossen werden sollte, dass andere bioaktive Proteine einen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen ausüben, die von den EBNA Zellen sezerniert werden.

Die Adhäsion der Zellen wurde alle 30 Minuten in den gleichen Arealen mikroskopisch mit Hilfe der ZEN Software fotodokumentiert. Anschließend wurden die adhärenen Zellen quantifiziert und ihr adhärenter Anteil als prozentualer Anteil der Gesamtzellen angegeben.

3.4.2 Testung der Proliferation von RPE Zellen unter dem Einfluss von Galektin-1 und Galektin-3

Zur Testung des Einflusses der Bioaktivität von Galektin-1 und Galektin-3 auf die Proliferation, wurden Zellen der Zellkulturlinie ARPE-19 und HUVEC Zellen verwendet. Als Marker für die Proliferation der Zellen wurde BrdU in das Zellkulturmedium gegeben, dass sich während der DNA-Synthese anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen einbaut (136). Es kann die Zellproliferation quantifiziert werden, da die Menge an eingebautem BrdU mit dem Maß an Proliferation gleichzusetzen ist. Zur Quantifizierung wurde das in die DNA eingebaute BrdU mittels ELISA nachgewiesen. Hierfür wurde das Kit „Cell Proliferation ELISA BrdU („colorimetric)“ von Roche genutzt.

Es wurden je Well 5000 Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät (vergleiche Kapitel Zellkulturen). Zunächst wurden die Zellen über Nacht auf der Platte bei 37°C mit 100 µl Medium DMEM Ham's F12 für die ARPE-19 Zellen bzw. Corneal Epithelial Cell Basal Medium für die HUVEC Zellen kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium ersetzt und je 100 µl der Testsubstanz auf ein Well aufgetragen. Hierbei bestand eine Zeile je aus je 4 Wells. Je Well wurden 1 µl BrdU 1:1000 verdünnt hinzugegeben und die Zellen anschließend mit BrdU und der Testsubstanz für weitere 24h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Verteilung der Substanz auf die einzelnen Wells war wie folgend für die ARPE-19 Zellen:

1. Well 1-4: 50 µl DMEM Ham's F12 Medium + 50 µl konditioniertes Medium der nicht transfizierten EBNA 293-HEK Zellen + 1 µl BrdU
2. Well 5-8: 50 µl DMEM Ham's F12 Medium + 50 µl konditioniertes Medium mit rekombinanten Galektin-1 konditioniertem Medium + 1 µl BrdU
3. Well 9-12: 50 µl DMEM Ham's F12 Medium + 50 µl konditioniertes Medium mit rekombinanten Galektin-3 konditioniertem Medium + 1 µl BrdU

Der Versuch wurde unter gleichem Aufbau für die HUVEC Zellen durchgeführt, hierbei wurde Endothelial Cell Growth Medium anstelle von DMEM Ham's F12 verwendet.

Well 1-4 wurden als Kontrollen verwendet, da sich hier kein rekombinantes Galektin im konditionierten Medium befand (vergleiche Kapitel 3.3.3).

Nach der Inkubationszeit wurde das konditionierte Medium entfernt. Im folgenden Schritt wurde ein FixDenat zur DNA Denaturierung für 30 Minuten hinzugefügt. Danach wurde der Anti-BrDu Antikörper zur Markierung der neusynthetisierten DNA für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgen drei Waschdurchgänge mit PBS bevor die Substratsubstanz mit Tetramethyl-Benzidine hinzugegeben und bis zur Farbentwicklung inkubiert wurde. Die Peroxidase des Antikörpers sorgte durch Substratumsetzung des Tetramethyl-Benzidine für eine blaue Farbe. Der Farbumschlag wurde mit Hilfe von Schwefelsäure gestoppt. Die Immunkomplexe wurden anschließend durch die Absorbierung der Wellenlänge mit Hilfe des multiwell- Spectrophometer quantifiziert. Hierfür wurden die Differenz der beiden Wellenlängen 450 nm und 690 nm zur Auswertung verwendet. Die entstanden Absorptionswerte sind gleichzusetzen mit der Menge an proliferierenden Zellen. Die Auswertung wurde mit Hilfe des SpectraMax® Plus 384 Microplate Reader Spectrophotometer und der SoftMax® Pro 7 Software vorgenommen und in Excel für die weitere Auswertung übertragen. Der Versuch wurde fünfmal unter den gleichen Bedingungen mit unterschiedlichem gesammeltem konditioniertem Medium durchgeführt und ausgewertet.

3.4.3 Graphische und Statistische Auswertung der Bioaktivität der rekombinanten Galektine

Die graphische Auswertung der Adhärenz wurde mit Excel durchgeführt und die Adhäsionswerte zu den verschiedenen Zeitpunkten in Form eines Liniendiagrammes dargestellt.

Die graphische Auswertung der Proliferation erfolgt ebenfalls mit Excel und wurde durch ein Säulendiagramm graphisch veranschaulicht.

Zur statistischen Auswertung der unterschiedlichen Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit SPSS (Firma IBM, Version Statistics 27) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde durch einen α - Fehler von 0,05 festgelegt.

Zur statistischen Auswertung der Adhäsion wurden 4 unterschiedliche unabhängige Experimente mit je 7 verschiedenen zu vergleichenden Zeitpunkten durchgeführt, es ergab sich je Zeitpunkt und Gruppe n=9. Hierbei wurde zum

einen die Kontrollgruppe, ARPE-19 Zellen die in konditioniertem Medium ohne Galektine in einer 1:1 Verdünnung oder unverdünnt inkubiert wurden, mit der mit Galektin-1 oder Galektin-3 behandelten Gruppe verglichen. Zum anderen wurde, um eine Dosisabhängigkeit feststellen zu können, die Gruppen mit verdünnten und unverdünntem Galektin direkt miteinander verglichen.

Zur statistischen Auswertung der Proliferation wurden 5 unterschiedliche unabhängige Experimente durchgeführt mit je 3 verschiedenen Gruppen, deren Maß der Proliferation mit dem Spectrophometer ausgewertet wurde. Für jede Gruppe ergab sich $n=12$.

Bei inhomogen verteilter Varianz wurde nach der einfaktoriellen Varianzanalyse eine post-hoc Games-Howell Analyse durchgeführt, um den Zeitpunkt des statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen genau bestimmen zu können.

3.5 Affinitätschromatographie

3.5.1 Puffer

Tabelle 12: Puffer Affinitätschromatographie

	Puffer A, Waschpuffer	Puffer B, Elutionspuffer
Inhaltsstoffe	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.03 % CHAPS	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.03 % CHAPS 0.2 M lactose

3.5.2 Materialien

Tabelle 13: Chromatographie Materialien

Produkt	Firma	Firmensitz
Alpha Lactose Agarose	Sigma Aldrich	Taufkirchen,

		Deutschland
Aminophenyl β -Lactose Gel, 5 ml	Eylabs, Hycultec	Beutelsbach, Deutschland
Chromatographie Column (Econo-Pac® 7321010)	Bio Rad	Hercules, Californien

3.5.3 Grundlagen

Die Affinitätschromatographie wird genutzt, um ein bestimmtes Zielprotein aus einem Stoffgemisch zu isolieren (137). In dieser Arbeit war es das Ziel, dass rekombinante Galektin-1 und Galektin-3 aus dem konditionierten Medium zu isolieren. Das Prinzip basiert auf der reversiblen Bindung zwischen dem Zielprotein und einer Matrix (138). Die Matrix ist meist eine Agarose, bestehend aus einem Polysaccharid aus D-Galactose (139), an die kovalent mit einem Spacer ein Ligand gebunden ist. Der Spacer sorgt für den notwendigen Abstand zwischen der soliden Matrix und dem Liganden, sodass die Bindungswahrscheinlichkeit des zu isolierenden Proteins erhöht wird. Das Verfahren besteht aus 2 Phasen. In der ersten Phase, der stationären Phase, werden die Proteine reversibel durch ihre Bindungsspezifität zum Liganden an die Matrix gebunden. Dieses Gemisch wird dann auf eine Chromatographie Säule geladen. Diese enthält Poren spezifischer Größe, die die Agarose mit dem gebundenen Protein nicht hindurch lassen (140). Durch mehrmaliges Waschen mit dem Waschpuffer lassen sich ungebundene und unspezifische Proteine entfernen. In der zweiten Phase, der mobilen Phase, muss das Protein vom Liganden gelöst werden, um aus der Column isoliert werden zu können. Hierzu wurde ein Elutionspuffer genutzt, der einen Liganden mit hoher Affinität zum Zielprotein enthält. Das eluierte und angereicherte Protein kann anschließend in einem sterilen Gefäß aufgefangen werden.

3.5.4 Synthese nicht konventioneller Epoxy-activated Sepahrose gekoppelt mit β -Lactose

3.5.4.1 Puffer

Tabelle 14: Puffer zur Synthese nicht konventioneller Epoxy-activated Sepahrose gekoppelt mit β -Lactose

	Inhaltsstoff	Ph
Kopplungspuffer Carbonate Puffer	Sodium bicarbonate 0,0125 M Sodium carbonate 0,087 M NaCl 0.1M	11
Waschpuffer PBS		7.4
Acetate Puffer	Sodium acetate 0,00941 M Acetic acid 0,0059 M NaCl 0,5 M	4.0
Tris- HCL Puffer	Tris 121,14 g/l	8.0
Blockierungspuffer	1M Ethanolamine (Sigma Aldrich, Taufkirchen)	8.0

3.5.4.2 Materialien

Tabelle 15: Materialien zur Synthese nicht konventioneller beta Lactose Agarose

Produkt	Firma	Firmensitz

Epoxy-activated Sepharose	Merck	Darmstadt, Germany
β -Lactose	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

3.5.4.3 Protokoll zur Synthese der Agarose

Es wurde zunächst 1 g Pulver Epoxy-activated Agarose ausgewogen, mit destilliertem Wasser drei Mal gewaschen und der Überstand verworfen. Es wurde 200 μ mol β -Lactose für 1ml Medium im Kopplungspuffer aufgelöst und anschließend zum Medium mit der Agarose hinzugegeben. Es wird dabei 3,5 ml Medium-Agarose und 1,75 ml Puffer mit β -Lactose verwendet. Dies wurde dann im Wasserbad für 16 Stunden bei 34°C gegeben, um eine kovalente Verbindung zwischen dem Liganden und der Epoxy Gruppe der Agarose zu schaffen. Anschließend wurden nicht gebundene Liganden durch ein fünfmaliges Waschen mit 1xPBS entfernt. Um nicht reaktive Epoxy Gruppen zu inaktivieren, wurde Ethanolamine hinzugegeben und über Nacht bei 45 °C inkubiert. Zur Fertigstellung für die Chromatographie, wurde die Agarose jeweils dreimal mit dem Acetate Puffer mit einem ph von 4 und dreimal mit dem Tris-HCl Puffer mit einem ph von 8 im Wechsel equilibriert (siehe Tabelle 14) Bis zur Verwendung wurde die gewonnene β -Laktat Agarose bei 4° in 0.02 % Natriumazid gelagert.

3.5.5 Durchführung der Isolation von rekombinantem Galektin-1 und Galektin-3

Zur Isolation wurde das gesammelte konditionierte Medium ohne FCS genutzt (siehe Kapitel: 3.1.6). Um Zellreste zu entfernen, wurde das Medium zunächst 20 Minuten bei maximaler Umdrehung und 4°C zentrifugiert. Es wurde einmal α -Lactose Agarose und in einem weiteren Versuch β -Lactose Agarose verwendet (siehe Tabelle 13). Bevor die Lactose-Agarose zum konditionierten Medium gegeben wurde, wurde sie zunächst mit 10 ml H₂O gewaschen. Es wurde 60 μ l der Agarose in Wasser suspendiert und eine Minute bei 1000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Lactose-Agarose Pellet in 2 ml Waschpuffer suspendiert.

Um die Bindung der rekombinanten Galektine aus dem konditionierten Medium möglich zu machen, wurde das zentrifugierte konditionierte Medium zur Lactose-Agarose Lösung hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Um die Bindung zwischen der Lactose im Agarosegel und den rekombinanten Galektinen im konditionierten Medium zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit in weiteren Versuchen variiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4° durchgeführt.

Anschließend wurde die Lösung auf die Chromatographiesäule geladen. Die Matrix wurde dreimal mit 25 ml des Waschpuffers gewaschen (vergleiche Tabelle 12) und darauf geachtet, dass sie niemals austrocknet. Danach wurde 2 ml Elutionspuffer zur Lösung der Galektine aus der Säule hinzugegeben und der Durchfluss in einem sterilen Gefäß aufgefangen. Dieser Prozess wurde mehrmals wiederholt.

Im Verlauf des Versuches wurden nach jedem Schritt Proben zur Kontrolle für eine Western Blot Analyse entnommen, sowie auch aus der resultierenden Endsubstanz, die das konzentrierte, auf gereinigte Galektin-1, bzw. Galektin-3 enthalten sollte.

Als positiv Kontrolle wurde das rekombinante konventionelle Galektin verwendet, welches uns freundlicher Weise aus dem Helmholtzzentrum in München zur Verfügung gestellt wurde.

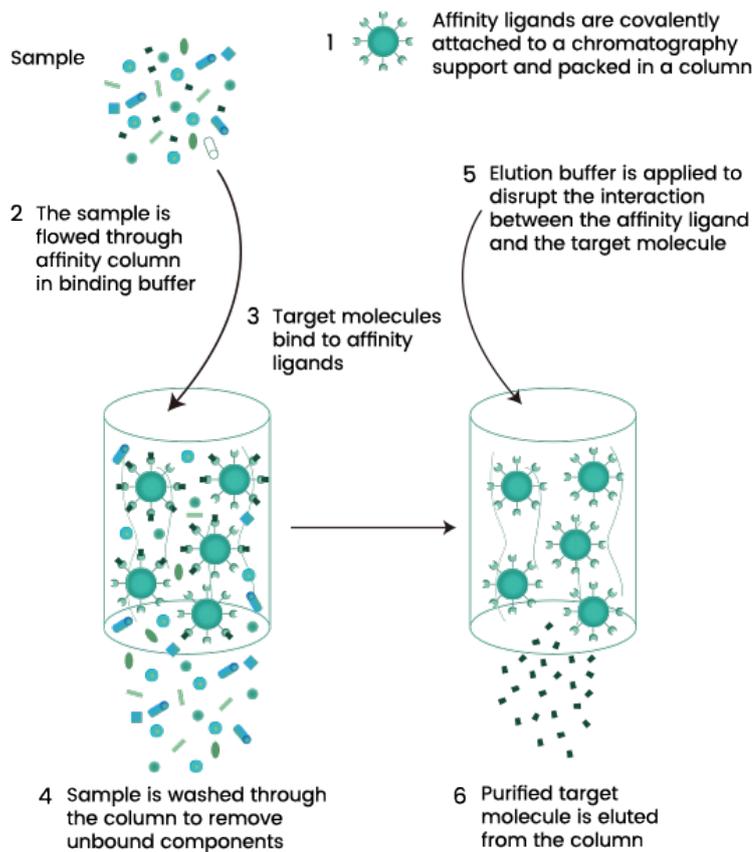


Abbildung 8: Schritte der Affinitätschromatographie, veröffentlicht auf sinobiological.com (141)

3.5.6 Chromatographie durch Zentrifugation ohne Säule

Zur Chromatographie ohne Säule (Column) wurden die gleichen Puffer A und B verwendet wie zur Affinitätschromatographie (siehe Tabelle 12).

Der gesamte Versuch wurde in einem 50 ml Zentrifugationstube durchgeführt. Im ersten Schritt wurde 2,5 ml des konditionierten Mediums mit 120 µl Aminophenyl-β-Lactose Agarose (siehe 3.5.2.) bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Tube bei 20°C und 2000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sterilen Verhältnissen abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in 25 ml Puffer A re-suspendiert und für 10 Minuten auf dem Rollmischer inkubiert. Danach wurde es wieder bei 20°C und 2000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang insgesamt zwei weitere Male mit dem Puffer A wiederholt. Anschließend wurde zur Elution des Galektins die Agarose in 1ml Puffer B re-suspendiert. Nach

erneuter Zentrifugation sollten sich die rekombinanten Galektine in der wässrigen Phase der Elutionslösung befinden. Das Pellet wurde verworfen und die Lösung mit den potenziellen Galektinen wurde aufgefangen und zur Aufbewahrung im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Zur Kontrolle des Versuchsablaufes wurden nach jedem Versuchsschritt Proben für eine Western Blot Analyse entnommen.

3.6 Aufreinigung der rekombinanten Galektine aus konditioniertem Medium

3.6.1 Konzentrierung mit Hilfe der Zentrifugalkonzentratoren

Die verwendeten Konzentratoren sind Ultrafiltrationsröhrchen, mit einer vertikalen polyethersulfon Membran (PES). Durch die Porengröße der PES Membran konnten die gelösten Proteine nach ihrer Größe mittels Zentrifugation in zwei Fraktionen aufgeteilt werden. Neben Proteinen können auch Puffer und andere flüssige Bestandteile, wie das Zellkulturmedium, die Membran passieren. Der molecular weight Cut-off Wert, kurz MWCO, beschreibt in diesem Versuch die maximale Proteingröße, die die Membran noch passieren kann.

Es werden drei verschiedenen Konzentratoren genutzt, die je einen unterschiedlichen Cut-off Wert haben, um die rekombinanten Galektine im konditionierten Medium zu isolieren, beziehungsweise stark zu konzentrieren.

3.6.2 Materialien

Tabelle 16: Zentrifugalkonzentratoren

Produkt	Firma	Firmensitz
Pierce Protein Concentrator PES, 30K MWCO	ThermoFisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Pierce Concentrators PES; 50K MWCO	Protein	Thermofisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
VIVASPIN 2 Protein Concentrator 12K MWCO		Sartorius stedim, biotech	Göttingen, Deutschland

3.6.3 Konzentrierung von rekombinantem Galektin-1 aus konditioniertem Medium

Galektin-1 hat ein Molekulargewicht von ca. 15 kDA. Somit kann der Proteinkonzentrator mit einem MWCO von 12kDA genutzt werden, um einen großen Teil der kleineren Proteine zu entfernen.

Hierfür wurde 2 ml des konditionierten Mediums mit rekombinantem Galektin-1 in den Zentrifugalkonzentrator gegeben und mit 8000 upm bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgefangen und für weitere Experimente verwendet. Zur anschließenden Western Blot Analyse wurde sowohl vom Überstand als auch vom Durchfluss Probenentnommen.

Anschließend wurde der Überstand aus der ersten Zentrifugation in einen Proteinkonzentrator mit einem MWCO von 30 kDA gegeben, um auch größere Proteine entfernen zu können. Auch hierfür wurden der Zellkulturüberstand mit 8000 upm bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Bei diesem Experiment wurde der Durchfluss aufgefangen und der Überstand verworfen. Es wurden aus Durchfluss und Überstand Proben zur Western Blot Analyse entnommen. Das potenziell konzentrierte Galektin-1 Medium wurde anschließend bei 4°C gelagert.

3.6.4 Konzentrierung von rekombinantem Galektin-3 aus konditioniertem Medium

Galektin-3 hat ein Molekulargewicht von circa 35 kDA. Um zunächst einen großen Teil der kleineren Proteine zu entfernen, wurde ein Proteinkonzentrator mit einem Cut-off von 30 kDA genutzt und mit 8000 upm bei 4°C für 5 min

zentrifugiert. Zur Kontrolle wurden auch hier Proben für eine Western Blot Analyse aus dem konditionierten Medium mit rekombinantem Galektin-3 und je eine Probe aus Durchfluss und Überstand entnommen.

In einem zweiten Versuch wurde der Überstand in einen Proteinkonzentrator mit einem Cut-off Wert von 50 kDa gegeben, um größere Proteine zu entfernen. Nach Zentrifugation mit 8000 upm bei 4°C für 5 min wurde wieder der Durchfluss aufgefangen und der Überstand verworfen und durch Probenentnahme mit einer Western Blot Analyse überprüft. Das potenziell konzentrierte Galektin-3 Medium wurde anschließend bei 4° gelagert.

3.6.5 Zugabe von SDS und DTT zum konditionierten Medium

Um ausschließen zu können, dass die rekombinanten Galektine bereits gebunden an andere Proteine im konditionierten Medium vorliegen, wurde wie auch zur Vorbereitung vor der Western Blot Analyse, SDS und DTT zum konditionierten Medium zugegeben. SDS sorgt für die Auflösung von sekundären und quartären Proteinstrukturen, DTT löst Disulfidbrücken. Anschließend wird die Probe für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um eine Proteindenaturierung erreichen und die Proteinkonzentrierung in den Zentrifugalkonzentratoren nach Protokoll durchgeführt (vergleiche 3.6.1).

3.7 Dialyse des rekombinanten Mediums zur Proteinaufreinigung von Galektin

Produkt	Firma	Firmensitz
Spectra/Por Dialyse Membran MWCO 50 kD	Repligen (Part Number: 132130)	Waltham, Massachusetts, United States

Visking Membran MWCO 12000-14000	Dialysis	Medical International LTD	Liverpool Road London, Großbritannien
PBS		Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 17: Dialyse Materialien

3.7.1 Grundlagen Proteindialyse

Das Verfahren der Proteindialyse beruht auf einem Dialyseschlauch, der eine semipermeable Membran enthält. Diese Membran ist größenabhängig durchlässig für Proteine, niedermolekulare Stoffe und Salze. Somit ist die Flussrichtung vom Inneren des Schlauches nach außen, immer von einer höheren Konzentration zu einer niedrigeren (142). Die Proteingröße, die durch den Schlauch noch zurückgehalten werden kann, wird als molecular weight cut off (MWCO) angegeben. Die zu dialysierende Flüssigkeit, die in unserem Fall das konditionierte Medium darstellt, wird in das Innere des Schlauches gegeben und der Schlauch mit zwei Klemmen verschlossen. Außerhalb befindet sich ein geeigneter Puffer in einem Glaszylinder, in unserem Fall wählten wir PBS mit einem pH von 7,4. Bei Verwendung des Dialyseschlauchs mit einem MWCO von 12-14 kDa sollten die rekombinanten Galektin-1 und Galektin-3 im Dialyseschlauch verbleiben, den Schlauch mit 50 kDa sollten die rekombinanten Galektine durchschreiten können.

3.7.2 Versuchsvorbereitung

Vor Verwendung wurde der Dialyse Schlauch mit einem Cut-off Wert von 12-14 kDa zunächst in Wasser hydriert um von Glycerin befreit zu werden (143). Die Vorbereitung der Dialysemembran fand unter sterilen Verhältnissen unter der Zellkulturbank mit Abzug statt. Der genutzte Schlauch der Firma Repligen, mit einem Cut-off Wert von 50 kDa (Tabelle 17), ist bereits in 0,05 % Natrium-azid eingelegt und muss somit vor Gebrauch nicht in Wasser hydriert werden. Der Schlauch wurde vor Verwendung mehrmals mit PBS gewaschen.

3.7.3 Dialyse des konditionierten Mediums, Proteinentfernung kleinerer Proteine

Zunächst wurde eine Zellulosemembran mit einem MWCO von 14 kDa verwendet. Der hydrierte Schlauch wurde mit dem gesammelten konditionierten Medium befüllt und an beiden Seiten mit zwei Klammern fest verschlossen. Anschließend wurde er in den vorbereiteten Glaszylinder gegeben, in dem der Schlauch an der Oberfläche zum Schwimmen kam. Der Zylinder wurde über Nacht bei 4°C auf den Magnetrührer (C-MAG HS 7, IKA) gestellt und mit Folie abgedichtet. Am nächsten Tag wurden Proben zur Kontrolle der Protein Aufreinigung aus dem Glaszylinder sowie aus dem Dialyseschlauch für eine Western Blot Analyse entnommen.

3.7.4 Dialyse des konditionierten Mediums, Proteinentfernung größerer Proteine

Um das rekombinante Galektin weiter zu isolieren, mussten auch größere Proteine aus dem konditionierten Medium entfernt werden. Hierfür wurde im nächsten Schritt die Dialyse Membran mit einem Cut-off Wert von 50 kDa verwendet. Es wurde das konditionierte Medium aus dem Dialyseschlauch des ersten Versuches (siehe 3.7.3) entnommen und in den zweiten Dialyseschlauch gegeben. Auch dieser wurde wieder über Nacht in PBS in einem Glaszylinder bei 4°C auf einen Magnetrührer gestellt. Anschließend wurde am nächsten Tag Proben für den Western Blot Analyse aus dem Zylinder und aus dem Dialyseschlauch entnommen. Die Flüssigkeit aus dem Erlenmeyerkolben sollte nun das rekombinante konzentrierte Galektin-1, beziehungsweise Galektin-3 enthalten und wird daher gesammelt.

3.7.5 Aufreinigung des konzentrierten Galektin nach der Dialyse

Im nächsten Schritt sollte das rekombinante Galektin nach der Dialyse aus der gewonnenen Dialyseflüssigkeit im Erlenmeyerkolben isoliert werden. Hierfür musste möglichst viel des Puffers entfernt werden. Dies geschieht mit Hilfe des Pierce Protein Concentrator mit einem MWCO von 30 kDa für Galektin-3 und mit dem Protein Konzentrator mit einem MWCO von 12 kDa für Galektin-1 (siehe Tabelle 16). Das konditionierte Medium aus dem Glaszylinder nach der Dialyse wurde in den Konzentrator gegeben und mit Hilfe von mehrmaligem

Zentrifugieren getrennt (vergleiche 3.6.1), sodass am Ende nur wenige Milliliter Flüssigkeit übrigbleiben, die hoch konzentriertes Galektin enthalten sollten. Zur Kontrolle der Versuchsdurchführung, sowie des Versuchsergebnisses, wurden aus dem Konzentrator, aus dem Überstand sowie aus dem entstandenen potenziellen Galektin Konzentrat, Proben für eine Western Blot Analyse entnommen.

4. Ergebnisse

4.1 Kontrolle der Selektion

Zur Selektion von transfizierten Zell wurde das Antibiotikum Hygromycin verwendet, da das eingesetzte Plasmid ein Resistenzgen gegen Hygromycin enthält. Hierdurch wuchsen nach Zugabe von Hygromycin in das Zellkulturmedium nur die Zellen weiter, die das Plasmid enthielten. Die nicht transduzierten Zellen halten dieser Selektion nicht stand und sterben ab.

Drei Tage nach der Transformation wurde Hygromycin dem Zellkulturmedium beigesetzt. Hierdurch löste sich im Verlauf die überwiegende Mehrzahl der Zellen vom Boden der Zellkulturmedium Schale ab. Gleichzeitig konnte man die Bildung von Zellkolonien beobachten. Die abgestorbenen und abgelösten Zellen schwimmen frei im Zellkulturmedium und konnten somit durch einen Mediumwechsel entfernt werden.

4.2 Kontrolle Transfektion der EBNA-293-HEK Zellen

Zur Kontrolle, ob die Transfektion der Plasmid DNA für die transgene Expression von Galektin-1 und Galektin-3 in die EBNA-293 HEK Zellen gelungen war, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Proben aus gesammeltem konditioniertem Medium entnommen. Es wurden je 4 Proben Galektin-1, bzw. Galektin-3 nebeneinander aufgetragen und nach der Inkubation mit spezifischen Antikörpern mit Hilfe des Imaging System iBrightCI1000 detektiert und fotodokumentiert.

In der Western Blot Analyse zeigt sich sowohl für Galektin-1 als auch Galektin-3 ein spezifisches Signal bei ca. 35 und 14 kDa (Abbildung 10, 11). Es konnte somit von einer erfolgreichen Transformation für beide Plasmide ausgegangen und das konditionierte Medium für die nachfolgenden Experimente verwendet werden.

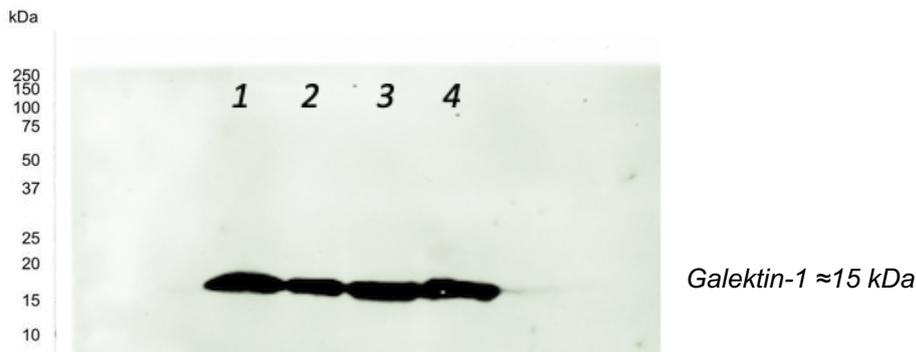


Abbildung 9: Western Blot Analyse für die Expression von Galektin-1 in konditioniertem Medium. 1-4: Konditioniertes Medium von Zellen nach Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid für Galektin-1.

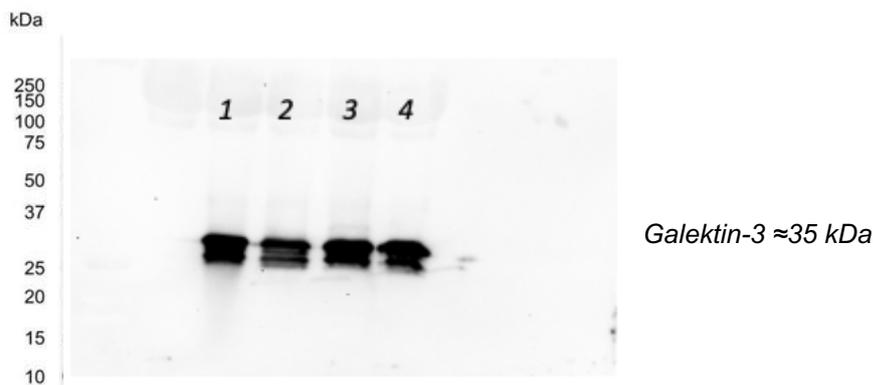


Abbildung 10: Western Blot Analyse für die Expression von Galektin-3 in konditioniertem Medium. 1-4: Konditioniertes Medium von Zellen nach Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid für Galektin-3.

4.3 Immunfluoreszenz Färbung der Zelllinien EBNA HEK Gals-1 und Gals-3

Um die transgene Expression von Galektin-1 und -3 durch ein weiteres unabhängiges Experiment zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt.

In unbehandelten Kontrollzellen zeigte sich lediglich ein schwaches unspezifisches Signal für Galektin-1 oder -3 (Abbildung 12, Bild B und D). Demgegenüber zeigten sowohl die Zellen mit einer transgenen Expression für Galektin-1 oder -3 eine deutliche vesikuläre Färbung für das entsprechende Protein, die überwiegend perinukleär lokalisiert war (Abbildung 12, Bild A und B).

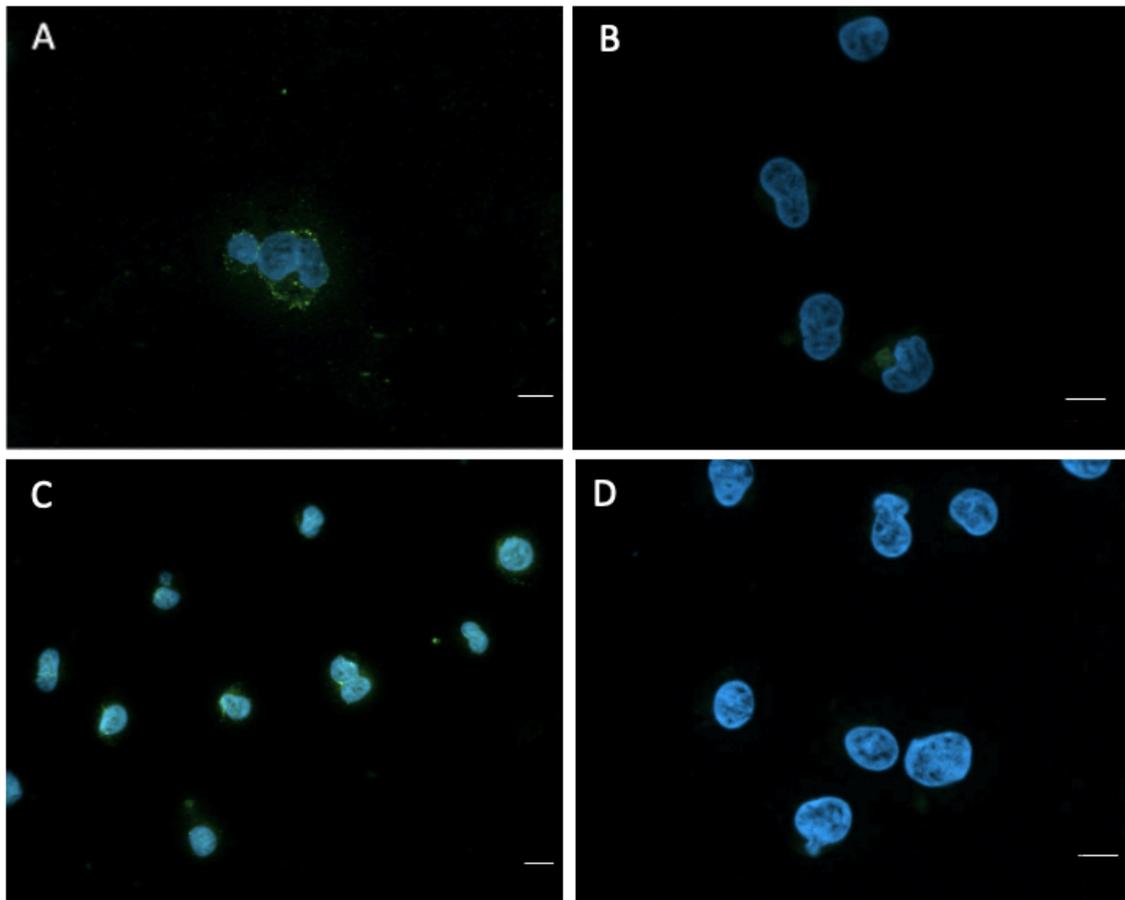


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung für Galektin-1 und -3 der transformierten HEK-293 EBNA Zelllinien. Immunfluoreszenzfärbung von HEK-293 EBNA Zellen nach Transfektion zur Überexpression mit dem Überexpressionsvektor für Galektin-1 (A) und Galektin-3 (C) sowie unbehandelten Kontrollzellen gegen Galektin-1 (A, B; grün) und Galektin-3 (C, D; grün). Die Zellkerne sind blau dargestellt; Messbalken: 20µm.

4.4 Testung der Bioaktivität

4.4.1 Testung der Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach

Inkubation mit Galektin-1 und -3 konditioniertem Medium

Nachdem die Expression von rekombinanten Galektin-1 und -3 gezeigt werden konnte, sollte anschließend untersucht werden, ob diese auch eine Bioaktivität aufweisen. Da bekannt ist, dass sowohl Galektin-1 als auch -3 die Adhäsion von immortalisierten RPE-Zellen hemmen kann, wurden ARPE-19 Zellen ausgesät und in konditioniertem Medium inkubiert. Die Anzahl der Zellen wurden alle 30 Minuten über einen Zeitraum von 3 Stunden dokumentiert und die Anzahl der adhärenen Zelle quantifiziert.

Da die genaue Konzentration der Galektine im konditionierten Medium nicht bekannt war, wurde zum einen das konditionierte Medium 1:1 mit frischem DMEM Ham's F12 Medium ohne FCS ausgesät zum anderen unverdünnt verwendet.

4.4.1.1 Fotodokumentation der Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit konditioniertem Medium mit Galektin-1

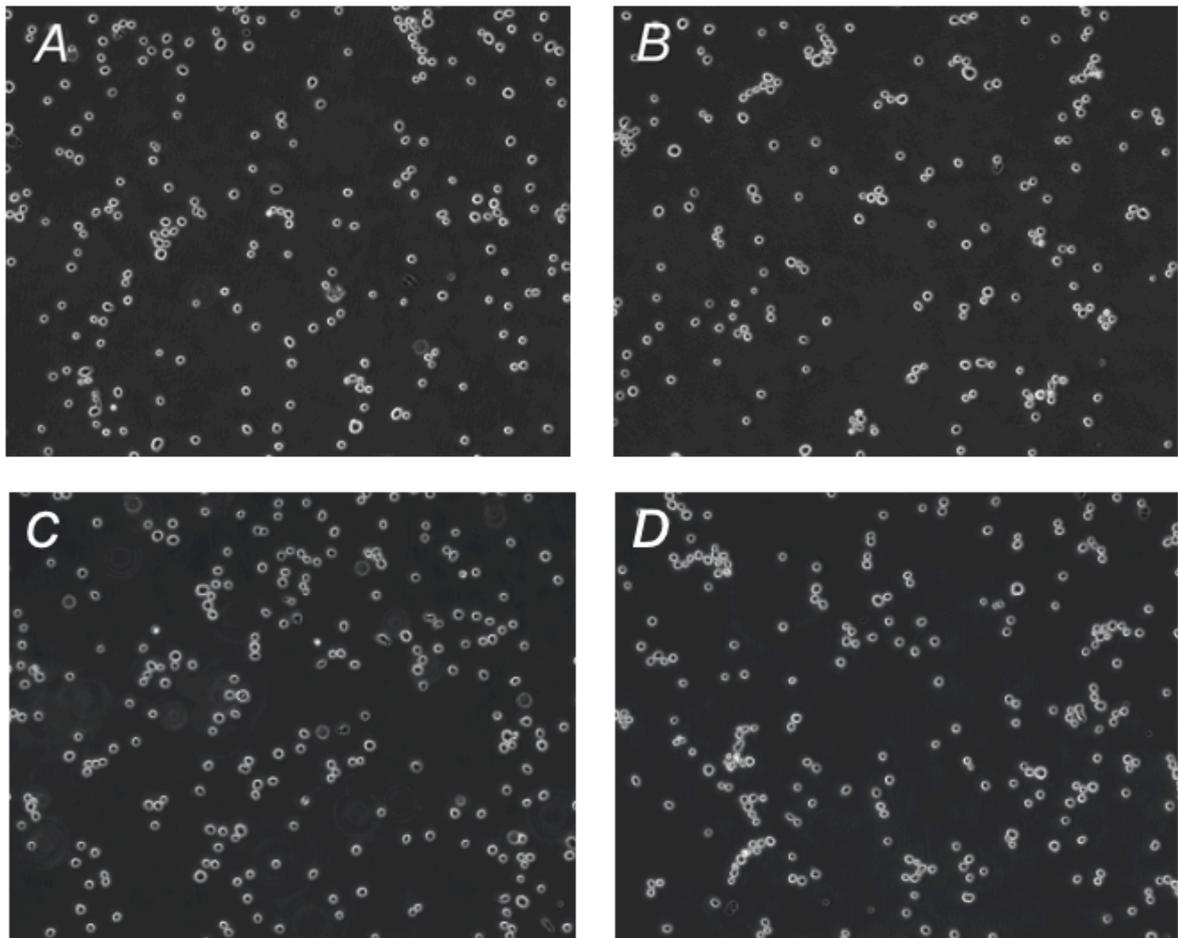


Abbildung 12: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 konditioniertem Medium direkt nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (D) direkt nach dem Aussäen fotodokumentiert.

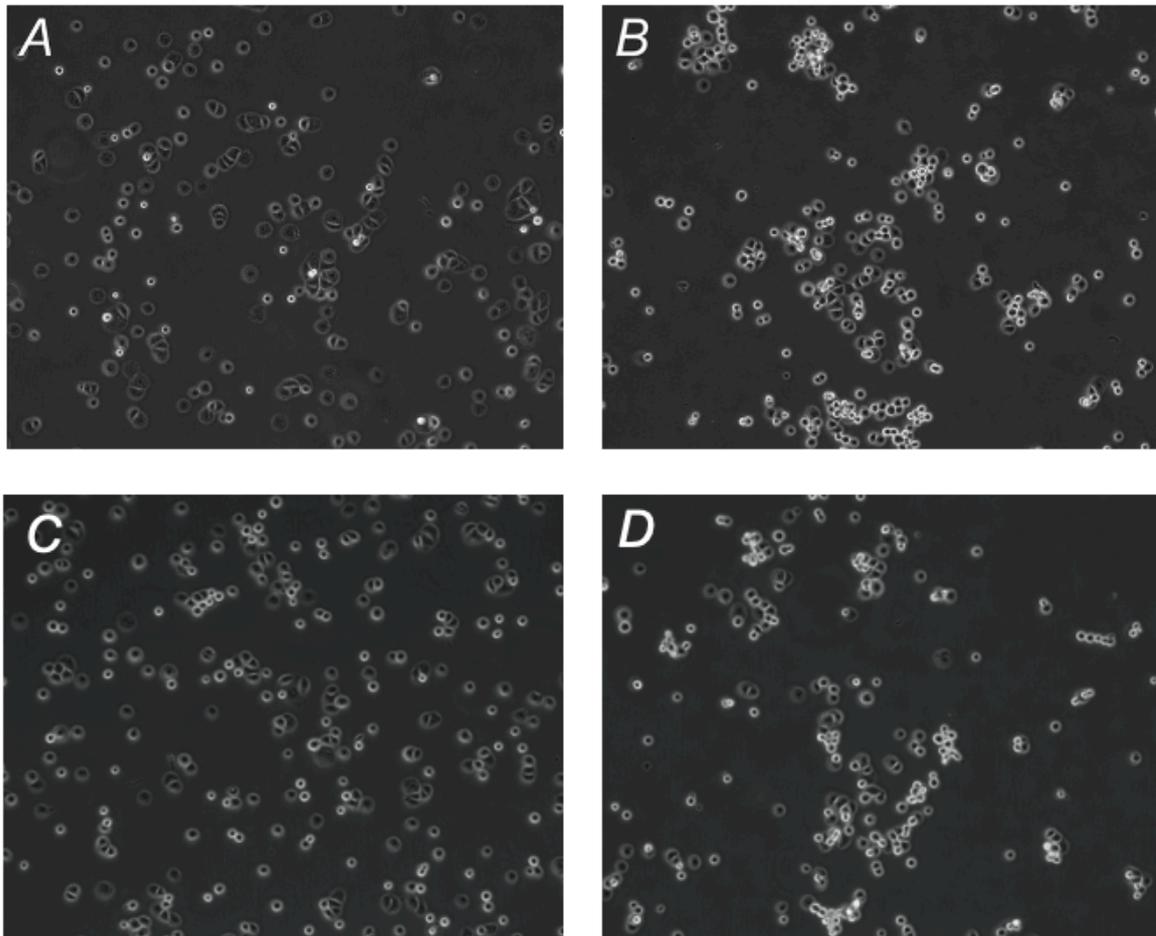


Abbildung 13: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 konditioniertem Medium 90 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektin (A), 50 % konditioniertem Medium Galektin-1 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektin (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (D) direkt nach dem Aussäen fotodokumentiert

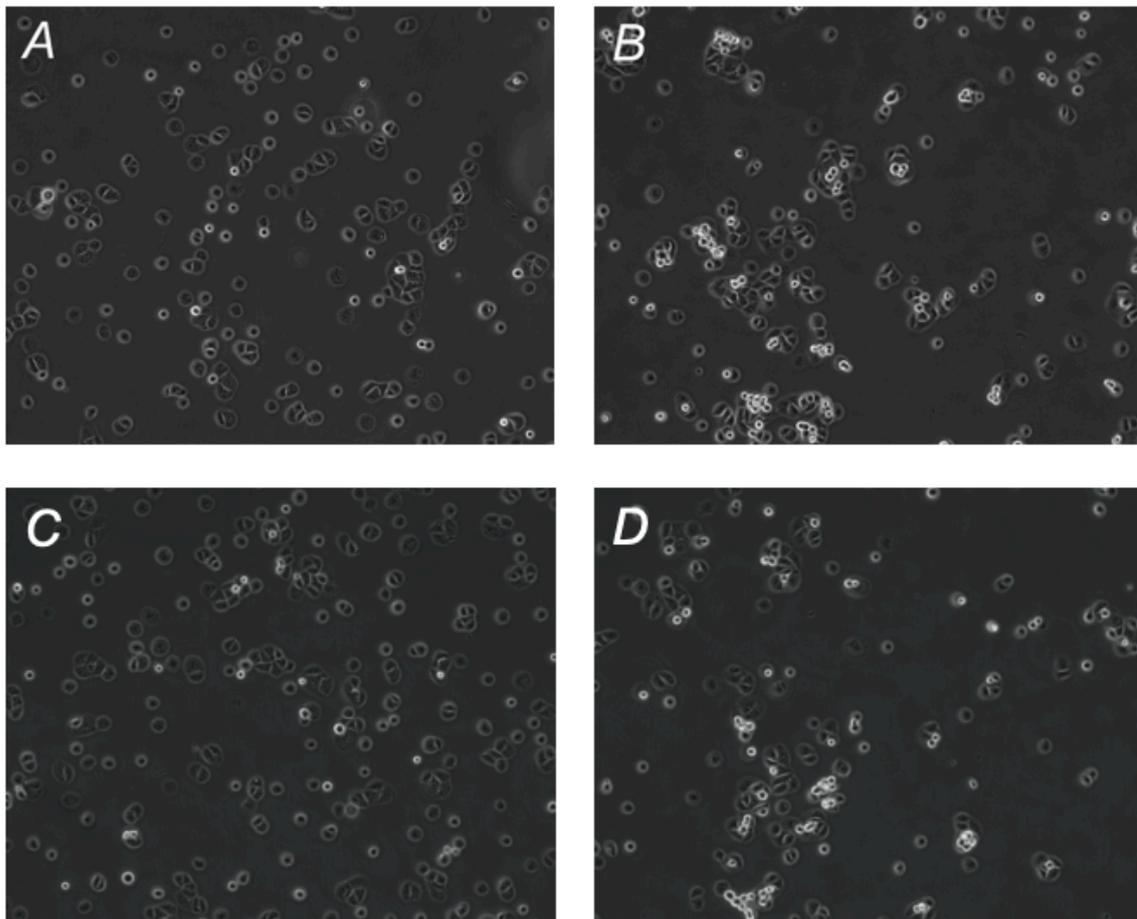


Abbildung 14: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 konditioniertem Medium 180 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (D) 180 Minuten nach dem Aussäen fotodokumentiert.

Zur Untersuchung der Adhäsion wurden ARPE-19 Zellen für 3 Stunden in konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-1 inkubiert und alle 30 Minuten Fotodokumentiert. Zellen, die abgerundet waren und ein zirkuläres helles Brechungsphänomen um den Zellkern aufwiesen, wurden als nicht adhärent gewertet. Zellen, die bereits erste zelluläre zytoplasmatische Fortsätze zum am Boden der Zellkulturschale zeigten, wurden als adhärent gewertet.

Direkt nach dem Aussäen lagen nahezu alle Zellen aller Gruppen abgerundet auf dem Boden des Zellkulturgefäßes (Abbildung 13). Nach 90 Minuten zeigten sich bereits in der Kontrolle, die mit 50% oder 100% konditioniertem Medium ohne rekombinante Galektine inkubiert wurden, die Mehrzahl der Zellen als

adhärent (Abbildung 14, Bild A und C). Demgegenüber waren die Anzahl der Zellen der ARPE-19 Zellen die in 50% oder 100% konditioniertem Medium mit rekombinantem Galektin-1 behandelt wurden, deutlich geringer (Abbildung 15, B und D). Nach 180 Minuten fanden sich nur noch vereinzelt nicht adhärente Zellen in beiden Kontrollgruppen ohne Galektin-1 (Abbildung 15, Bild A und C), im Vergleich hierzu waren nach einer Inkubation mit Galektin-1-haltigem konditioniertem Medium noch ca. jede fünfte Zelle nicht adhärent (Abbildung 15, Bild B und D).

4.4.1.2 Fotodokumentation der Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit konditioniertem Medium mit Galektin-3

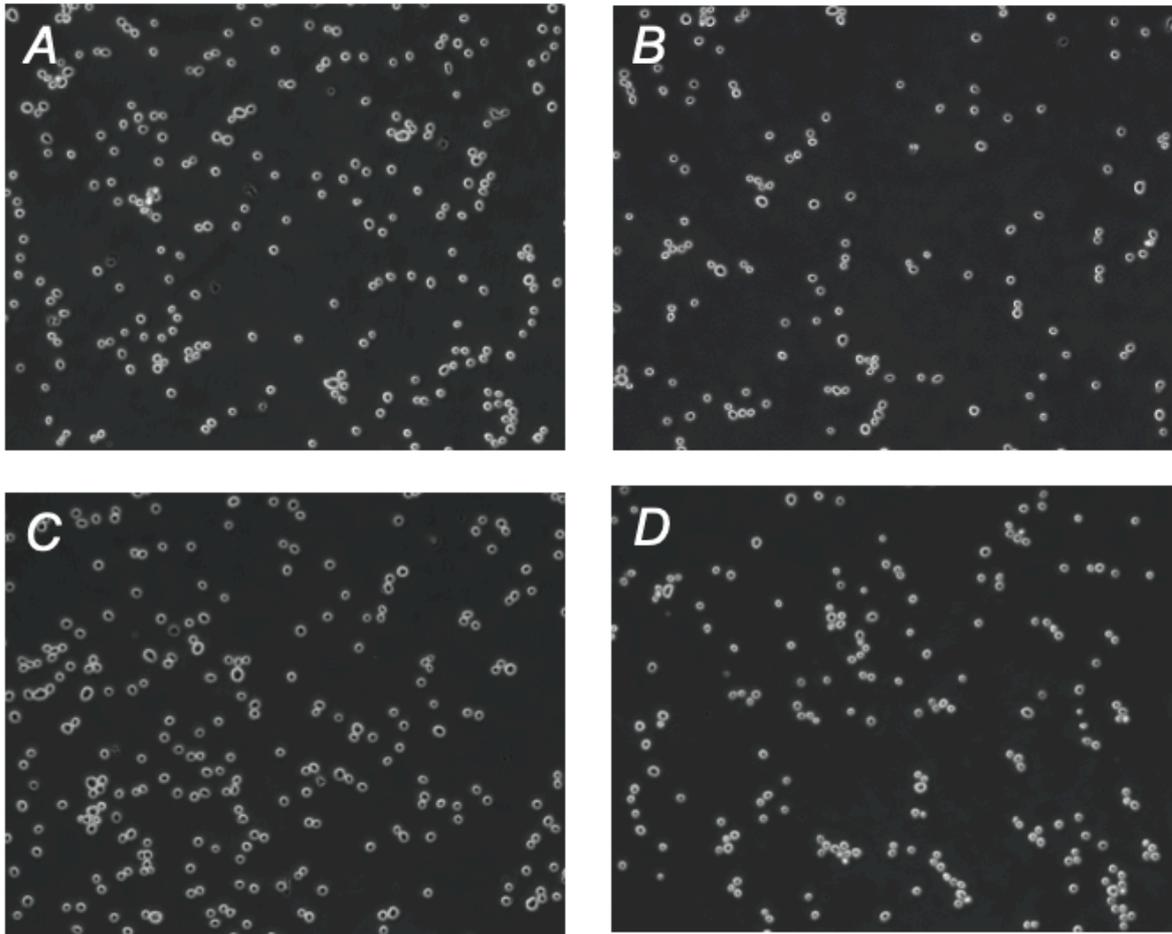


Abbildung 15: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-3 in konditioniertem Medium direkt nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (D) direkt nach dem Aussäen fotodokumentiert.

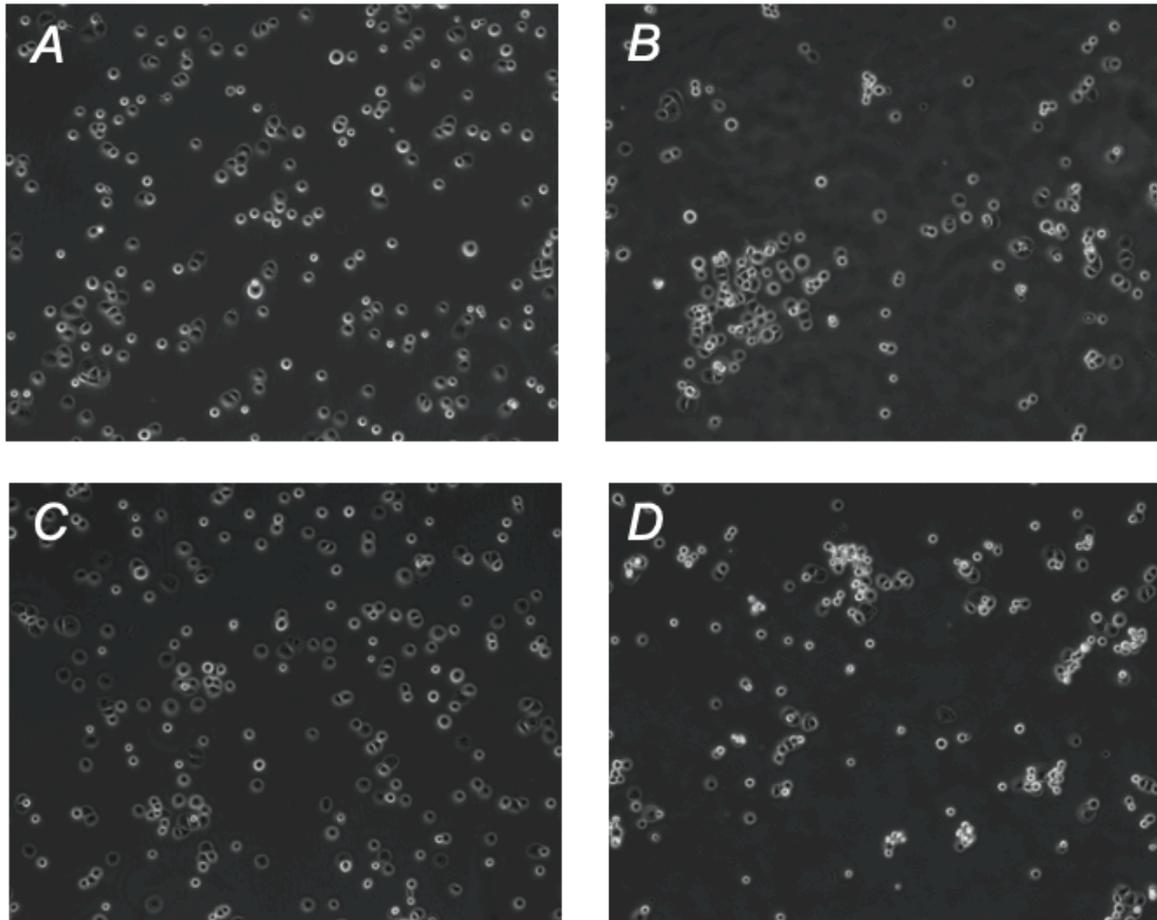


Abbildung 16: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-3 konditioniertem Medium 90 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (D) 90 Minuten nach dem Aussäen

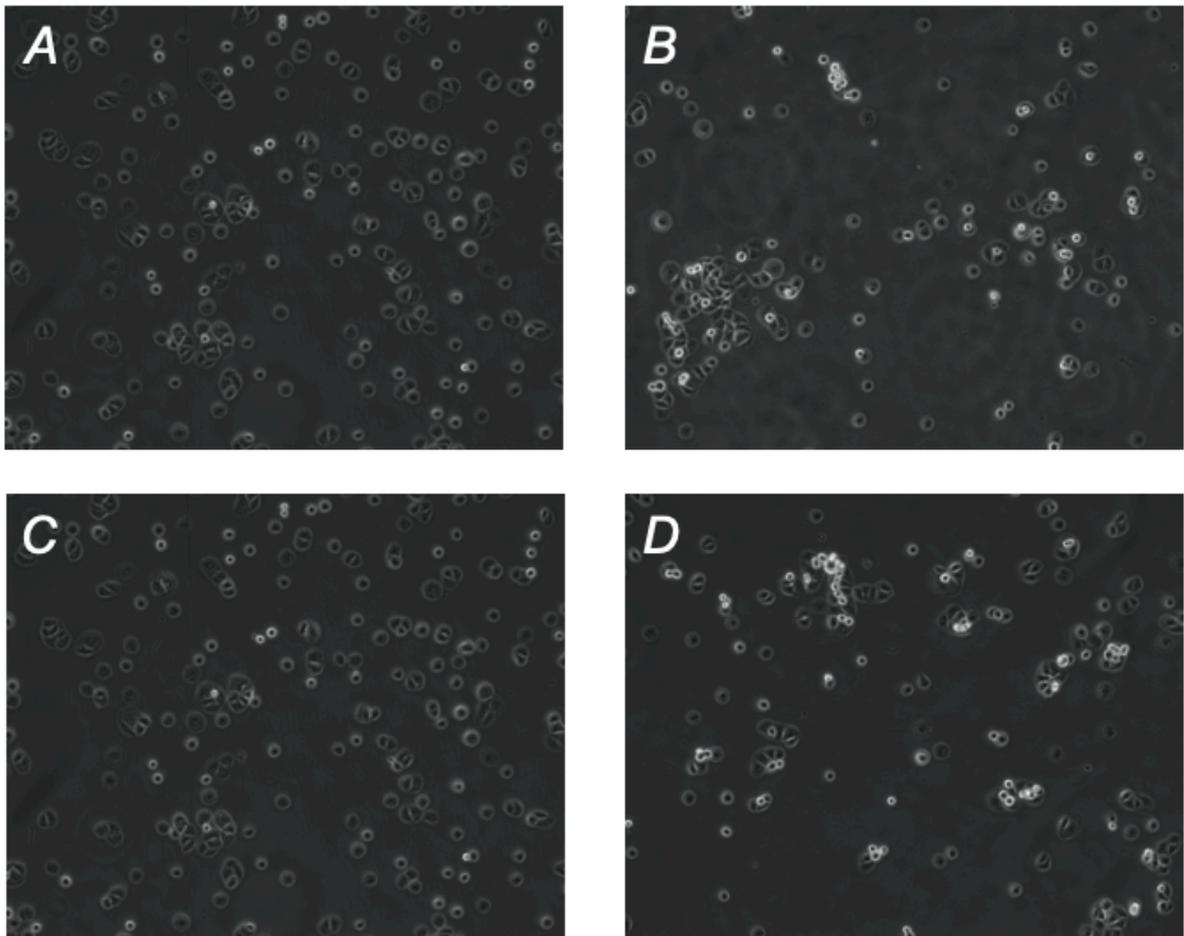


Abbildung 17: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-3 konditioniertem Medium 180 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (D) 180 Minuten nach dem Aussäen fotodokumentiert.

Wie bereits im Versuch für Galektin-1, wurden auch hier zur Untersuchung der Adhäsion ARPE-19 Zellen für 3 Stunden in konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-3 inkubiert und Fotodokumentiert. Die Auszählung erfolgte nach den gleichen Kriterien (siehe 4.4.1.1.).

Nach dem Aussäen zum Beginn des Beobachtungszeitraumes befanden sich nahezu alle Zellen aller Gruppen auf dem Zellkulturgefäßboden (Abbildung 16) in einer abgerundeten Form. Nach 90 Minuten zeigte sich bereits in der Kontrolle, sowohl in der verdünnten Form als auch für 100% konditioniertem Kontrollmedium, die Mehrzahl der Zellen als adhären (Abbildung 17, Bild A und

C), währenddessen in Galektin-3 konditioniertem Medium mit noch deutlich weniger adhärenente Zellen zu sehen waren (Abbildung 17, B und D). Nach 180 Minuten waren nahezu alle Zellen der Kontrollgruppe, die mit konditioniertem Medium ohne Galektine behandelt wurden, adhärenent (Abbildung 18, Bild A und C), wohingegen diesem Zeitpunkt in den mit Galektin-3 behandelten Gruppen nur rund 80 % der Zellen angeheftet waren (Abbildung 18, Bild C und D).

4.4.1.3 Quantifizierung der Adhäsionsanalyse von ARPE-19 Zellen nach Inkubation in konditioniertem Medium mit Galektin-1

Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der adhärenenten Zellen ermittelt und auf die Gesamtzahl der ausplattierten Zellen bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse und bei Inhomogenität der Varianzen mit der Games-Howell Analyse.

Bereits nach 30 min waren ca. 25% der ARPE-19 Zellen, die entweder in 50% oder 100% konditioniertem Medium ohne rekombinantes Galektin-1 inkubiert wurden, adhärenent am Boden der Zellkulturschale (Tabelle 18). Im weiteren Verlauf stieg die Anzahl der angehefteten Zellen deutlich an und betrug nach 60 min ca. 50% und nach 120 min ca. 85% in beiden Kontrollgruppen (Tabelle 18). Nach 180 min waren annähernd alle ARPE-19 Zellen, die in konditioniertem Kontrollmedium ausgesät wurden, mit einem Anteil von über 96% adhärenent (Tabelle 19). Zwischen der Anzahl der adhärenenten Zellen, die mit 50% oder 100% konditioniertem Kontrollmedium behandelt wurden, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Im Vergleich zu Kontrollzellen, wurde nach einer Behandlung der ARPE-19 Zellen mit rekombinantem Galektin-1 konditioniertem Medium bereits nach 30 min mit 5% bzw. 15% deutlich weniger adhärenente Zellen beobachtet (Tabelle 18). Auch bei fortgesetzter Beobachtung zeigten ARPE-19 Zellen mit einer Behandlung mit rekombinantem Galektin-1 eine geringere Anheftung an den Schalenboden als Kontrollzellen. Dieser Unterschied betrug teilweise annähernd 50% und war zu allen Zeitpunkten statistisch hoch Signifikant (Tabelle 18, Tabelle 19). Statistische Unterschiede zwischen ARPE-19 Zellen, die mit 50% oder 100% konditioniertem, rekombinantes Galektin-1-enthaltendes Medium, behandelt wurden, wurden nicht beobachtet (Tabelle 19). Eine direkte Dosisabhängigkeit konnte statistisch somit nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 18: Übersicht der Quantifizierung der Adhäsionsanalyse von ARPE-19 Zellen mit und ohne Galektin-1 Inkubation im Beobachtungszeitraum von 0 - 180 min (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Zeit	0 min.	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Adhärenz 50 %	2 % \pm 0,7 %	27 % \pm 5,1 %	56 % \pm 9,7 %	77 % \pm 7,6 %	84 % \pm 8,7 %	94 % \pm 3,1 %	96 % \pm 2,1 %
Kontrolle							
Adhärenz 100 %	0 % \pm 0,6 %	23 % \pm 2,8 %	49 % \pm 7,6 %	83 % \pm 3,9 %	88 % \pm 3,3 %	94 % \pm 1,9 %	97 % \pm 1,2 %
Kontrolle							
Adhärenz 50 % Gal1	0 % \pm 0,7 %	15 % \pm 9,1 %	33 % \pm 2,6 %	50 % \pm 4,3 %	65 % \pm 6,1 %	70 % \pm 7,6 %	78 % \pm 9,0 %
Kontrolle							
Adhärenz 100 % Gal1	1 % \pm 0,5 %	5 % \pm 2,4 %	24 % \pm 4,5 %	42 % \pm 4,4 %	56 % \pm 3,0 %	59 % \pm 1,6 %	69 % \pm 1,3 %
Kontrolle							

Tabelle 19: Post-hoc Test (Games-Howell) für die Adhäsion der APE-19 Zellen, die in 50 % und in 100 % konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-1 inkubiert wurden, tabellarische Darstellung der Signifikanz für den Unterschied zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen

Zeitpunkt nach dem Aussäen in Minuten	Galektin-1 50%, Unterschied Kontrolle 50% Signifikanz (p-Wert)	Galektin-1 100%, Unterschied Kontrolle 100 % Signifikanz (p-Wert)	Galektin-1 50 %, Unterschied Galekin-1 100 % Signifikanz (p-Wert)
30 min	0,083	0,000	0,184
60 min	0,000	0,000	0,839
90 min	0,004	0,000	0,999
120 min	0,007	0,000	0,840
150 min	0,000	0,000	0,820
180 min	0,001	0,001	0,575

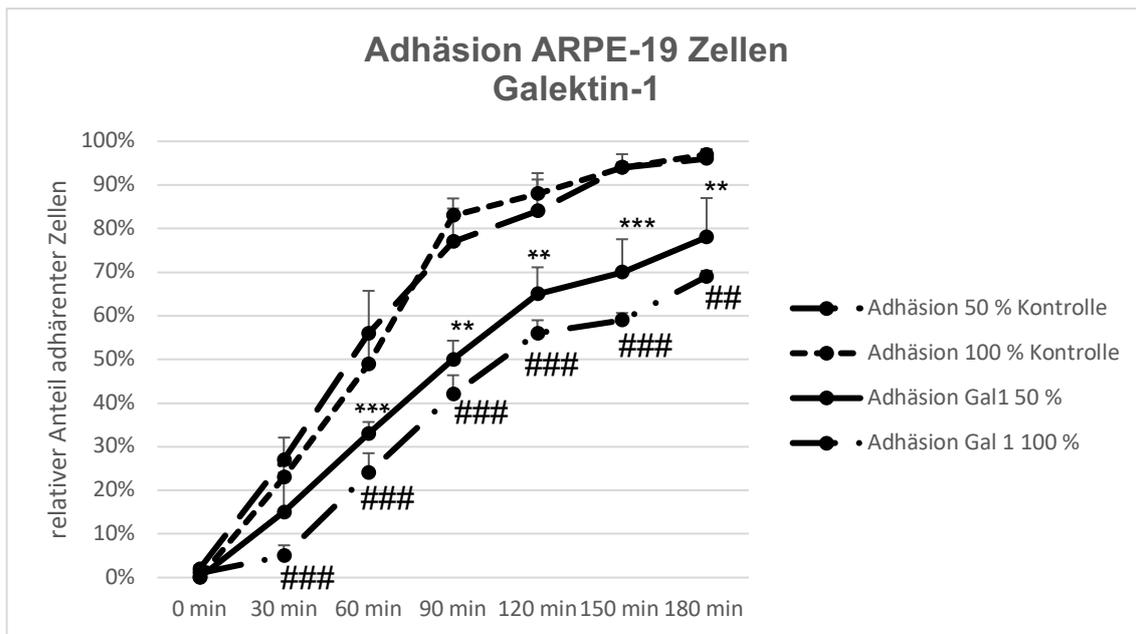


Abbildung 18: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-1 in 50 % und 100 % Konzentration

* 50% Gal1 versus 50% Kontrolle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$;

#100% Gal1 versus 100% Kontrolle, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$

Trypsinierte ARPE-19 Zellen wurden ausplattiert und in konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-1 in einer 1:1 Verdünnung oder unverdünnt inkubiert und über 3 Stunden beobachtet und dokumentiert. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der adhärenen Zellen zu jedem Zeitpunkt ermittelt und die Werte graphisch dargestellt.

Zusammenfassend zeigte die statistische Analyse in Zusammenschau mit der fotografischen Dokumentation einen signifikanten Unterschied in der Adhäsion von ARPE-19 Zellen in mit Galektin-1 konditioniertem Medium, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Galektin-1. Mit Zugabe von Galektin-1 wird die Adhäsion der Zellen verlangsamt (vergleiche graphische Darstellung Abbildung 18, sowie dazugehörige Tabelle 18). Es wurde nachgewiesen, dass dieser Effekt statistisch signifikant ist (Tabelle 19). Dies zeigte den potenziellen bioaktiven Einfluss des rekombinanten Galektin-1 im gesammelten konditionierten Medium, auf die Zellen des retinalen Pigmentepithels.

4.4.1.4 Statistische Auswertung der Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation in konditioniertem Medium mit Galektin-3

In der zweiten Auswertung wurde die Analyse von Galektin-1 auf Galektin-3 übertragen. Es wurden ebenfalls die adhärenen Zellen aus der Foto Dokumentation ermittelt und quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte

mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse und anschließend bei Inhomogenität der Varianzen mit der Games-Howell Analyse.

Es zeigte sich eine sehr ähnliche Entwicklung der Adhäsion, wie auch schon für Galektin-1 beschrieben (Tabelle 20). Die Kontrollzellen, die in konditioniertem Medium ohne Galektin-3 inkubiert wurden und hier zum Vergleich herangezogen wurden, waren dieselben wie für Galektin-1.

Während der Anteil adhärenter ARPE-19 Zellen im konditionierten Medium ohne Galektine schon nach 30 Minuten bei einem Viertel liegt, sind es unter Inkubation mit rekombinantem Galektin-3 zum selben Zeitpunkt gerade einmal 10 % (Tabelle 20). Nach einer Stunde befinden sich circa die Hälfte der Kontrollzellen adhärent am Zellkulturflaschenboden, diese Anzahl erreichen die ARPE-19 Zellen im konditionierten Medium mit rekombinantem Galektin-3 erst nach etwa 120 Minuten (Tabelle 20). Nach 90 Minuten sind 80 % der Zellen ohne Galektin-3 adhärent, mit Galektin-3 liegt der Anteil mit 48 % bzw. 40 % deutlich darunter (Tabelle 20). Nach 180 Minuten sind nahe alle Zellen der Kontrollgruppe adhärent, während die Zellen im konditionierten Medium mit rekombinantem Galektin-3 nur einen adhäsiven Anteil von 71 % im verdünnten konditionierten Medium und 64 % im unverdünnten konditionierten Medium erreichen (Tabelle 20).

Der Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen mit und ohne Galektin-3 ist ab dem zweiten Beobachtungszeitpunkt nach dem Aussäen für den gesamten Beobachtungszeitraum hoch signifikant (Tabelle 21). Auch hier konnten allerdings keine statistischen Unterschiede zwischen ARPE-19 Zellen, die mit 50% oder 100% konditioniertem Medium mit Galektin-3 inkubiert wurden, beobachtet werden (Tabelle 21). Eine direkte Dosisabhängigkeit konnte statistisch somit nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 20: Übersicht der Quantifizierung der Adhäsionsanalyse von ARPE-19 Zellen mit und ohne Galektin-3 Inkubation im Beobachtungszeitraum von 0- 180 min.

Zeit	0 min.	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Adhärenz	2 % ± 0,7 %	27 % ± 5,1 %	56 % ± 9,7 %	77 % ± 7,6 %	84 % ± 8,7 %	94 % ± 3,1 %	96 % ± 2,1 %

50 % Kontrolle							
Adhärenz 100 % Kontrolle	0 % ± 0,6 %	23 % ± 2,8 %	49 % ± 7,6 %	83 % ± 3,9 %	88 % ± 3,3 %	94 % ± 1,9 %	97 % ± 1,2 %
Adhärenz 50% Gal3	1 % ± 1 %	13 % ± 2,2 %	34 ± 0,5 %	48 ± 3,2 %	53 ± 4,4 %	65 ± 4,0 %	71 ± 8,4 %
Adhärenz 100 % Gal3	0 % ± 0,5 %	10 % ± 1,3 %	31 % ± 2,4 %	40 % ± 5,0 %	48 % ± 3,2 %	55 % ± 1,2 %	64 % ± 2,4 %

Tabelle 21: Post-hoc Test (Games-Howell) für die Adhäsion der APE-19 Zellen, die in 50 % und in 100 % konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-3 inkubiert wurden, tabellarische Darstellung der Signifikanz für den Unterschied zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen

Zeitpunkt nach dem Aussäen in Minuten	Galektin-3 50%, Unterschied Kontrolle 50% Signifikanz (p-Wert)	Galektin-3 100%, Unterschied Kontrolle 100 % Signifikanz (p-Wert)	Galektin-3 50 %, Unterschied Galekin-1 100 % Signifikanz (p-Wert)
30 min	0,181	0,000	0,553
60 min	0,005	0,000	0,515
90 min	0,000	0,000	0,671
120 min	0,007	0,000	0,298
150 min	0,000	0,000	0,555
180 min	0,001	0,001	0,368

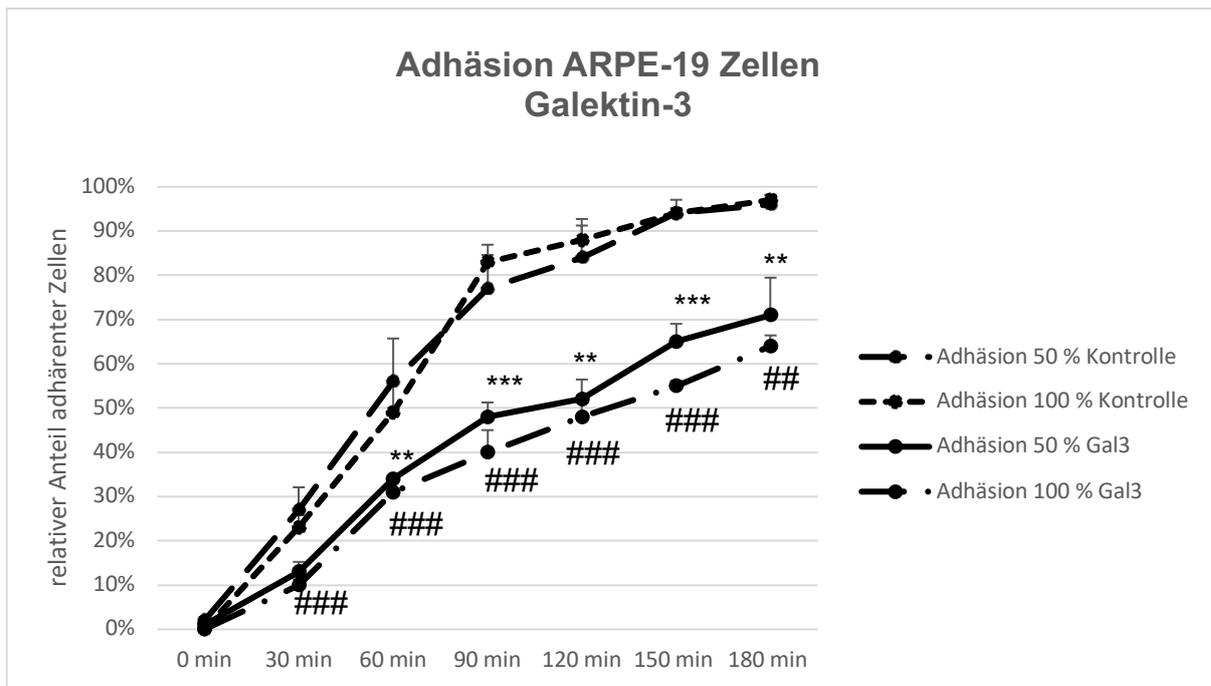


Abbildung 19: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit und ohne rekombinantem Galektin-3 konditioniertem Medium in 50-prozentiger und 100-prozentiger Konzentration. * 50% Gal3 versus 50% Kontrolle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$; #100% Gal3 versus 100% Kontrolle, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$**
Trypsinierte ARPE-19 Zellen wurden ausplattiert und in konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantes Galektin-3 in einer 1:1 Verdünnung oder unverdünnt inkubiert und über 3 Stunden beobachtet und dokumentiert. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der adhärenen Zellen zu jedem Zeitpunkt ermittelt und die Werte graphisch dargestellt.

4.4.2 Testung der Proliferation von ARPE-19 Zellen unter Einfluss von rekombinantem Galektin-1 und Galektin-3

Um den Einfluss von rekombinantem Galektin-1 und Galektin-3 auf die Proliferation von retinalen Pigmentepithelzellen zu untersuchen, wurde ein BrdU Proliferations ELISA durchgeführt und photospektrometrisch ausgewertet. Hierfür wurden die Zellen mit rekombinantem Galektin-1 oder Galektin-3 enthaltendem, konditioniertem, eins zu einem verdünnten Medium behandelt und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen.

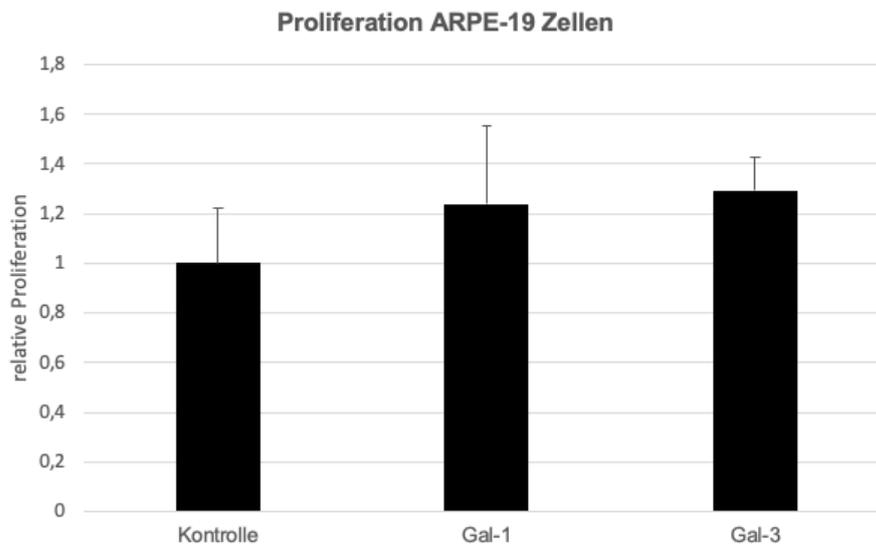


Abbildung 20: Proliferation der ARPE-19 Zellen mit konditioniertem Medium ohne (Kontrolle) oder mit rekombinantem Galektin-1, bzw. Galektin-3 als Säulendiagramm
Zur Testung der Proliferation von ARPE-19 Zellen wurde eine ELISA Proliferationsanalyse durchgeführt und die Proliferation anschließend quantifiziert und die mit rekombinantem Galektin behandelten Zellen mit einer Kontrolle verglichen.

Im Vergleich zu Kontrollzellen fand sich sowohl nach der Inkubation mit rekombinantem Galektin-1 oder Galektin-3 enthaltendem, konditioniertem Medium eine moderate Zunahme der Proliferation von ARPE-19 Zellen (Abbildung 20). Die statistische Auswertung ergab eine gesteigerte Proliferation von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit rekombinantem Galektin-1 von 23,9 % sowie nach Behandlung mit rekombinantem Galektin-3 von 29,3 %. Allerdings war die gemessene Steigerung der Proliferation im einfaktoriellem ANOVA-Test für beide rekombinanten Proteine nicht signifikant.

4.4.3 Testung der Proliferation von HUVEC Zellen unter dem Einfluss von rekombinantem Galekin-1 und Galekin-3

Der Einfluss des rekombinanten Galektin-1 und Galekin-3 wurde ebenfalls für die Proliferation von HUVEC Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 1:1 verdünntem Galektin-haltigem konditioniertem Medium inkubiert und die Proliferation mittels BrdU ELISA analysiert. Als Kontrolle wurde nicht-Galektin-haltiges konditioniertes Medium verwendet.

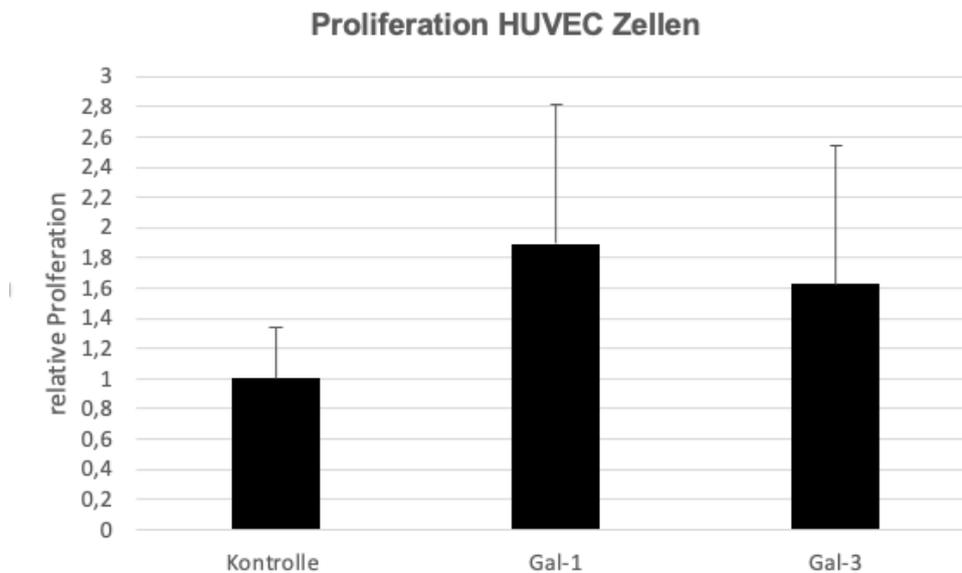


Abbildung 21: Proliferation der HUVEC Zellen nach Inkubation in konditioniertem Medium ohne Galektin (Kontrolle) oder mit rekombinatem Galektin-1, bzw. Galektin-3 als Säulendiagramm. Zur Testung der Proliferation von HUVEC Zellen wurde ein BrdU ELISA durchgeführt und die mit rekombinatem Galektin behandelten Zellen mit einer Kontrolle verglichen (Mittelwert \pm SD; n = 5 von 5 unabhängigen Experimenten).

Die Auswertung der 5 unabhängigen Experimente zeigte im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der Proliferation unter Zugabe von konditioniertem Medium mit rekombinatem Galektin-1 oder Galektin-3. Die statistische Analyse zeigte einen Anstieg der Proliferation für Galektin-1 von 89 % und für Galektin-3 von 62,5 % im Vergleich zur Kontrolle. Der Unterschied erwies sich in der angewandten Konzentration allerdings nur für die Inkubation der HUVEC Zellen mit rekombinatem Galektin-1 als signifikant ($p = 0,017$), nicht aber für Galektin-3 ($p = 0,097$).

4.5 Affinitätschromatographie von konditioniertem Medium zur Isolation von rekombinatem Galektin-1 und -3

4.5.1 α - Lactose Agarose Beads

Zur Isolation der Proteine Galektin-1 und Galektin-3 wurden zunächst α - Lactose Agarose Beads verwendet. Die Galektine sollten im ersten Schritt an die Beads der Agarose nach der Inkubation gebunden und dann durch das Laden auf die

Chromatographiesäule immobilisiert werden. Nach mehrmaligem Waschen sollten die rekombinanten Proteine mittels Waschpuffer eluiert werden.

Zur Kontrolle wurde nach jedem experimentellen Schritt Proben entnommen und anschließend eine Western Blot Analyse durchgeführt, um mögliche Fehlerquellen des Isolationsprotokolls zu identifizieren.

Im konditionierten Medium konnte ein deutliches Signal für rekombinantes Galektin-1 oder -3 in der Western Blot Analyse beobachtet werden. Nach Inkubation mit den α -Lactose-Agarose Beads zeigte sich im Überstand des Inkubationspuffer sowohl für Galektin-1 und -3 ebenfalls eine deutliche Bande im Vergleich zum konditionierten Medium (Abbildung 22 und 23). Nachdem Laden der α -Lactose-Agarose Beads auf die Chromatographiesäule zeigte sich ein ähnlich starkes Signal für Galektin-1 und -3 im Vergleich zum Durchlauf. Nach den entsprechenden Waschschrritten konnte kein Galekin mehr detektiert werden. Lediglich für Galektin-3 zeigte sich eine schwache Bandenbildung nach Elution (Abbildung 23).

Eine Isolation und Anreicherung der rekombinanten Galektine aus dem konditionierten Medium gelang somit nicht unter Verwendung der α -Lactose Agarose Beads.

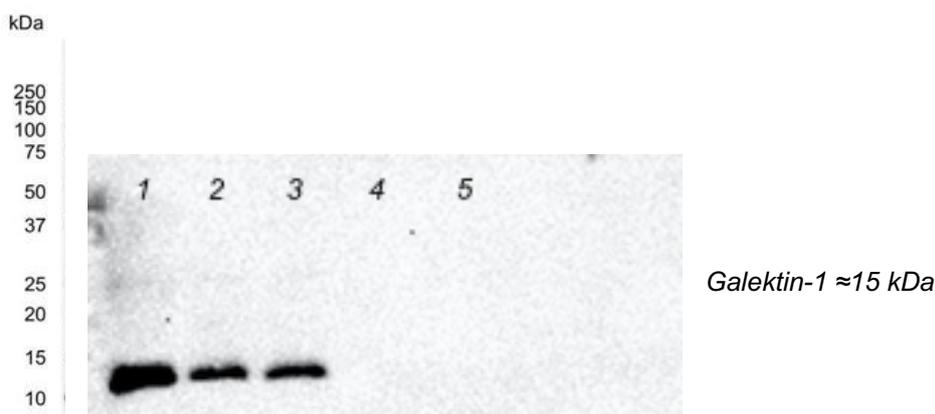


Abbildung 22: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression nach Chromatographie

- 1: Probe aus gesammeltem konditioniertem Medium Galektin-1
- 2: Probe konditioniertes Medium nach Inkubation mit der α -Lactose-Agarose
- 3: 1. Probe aus dem Durchlauf nach dem Laden der α -Lactose-Agarose auf die Säule
- 4: 2. Probe aus dem Erlenmeyerkolben nach dreimaligen Waschen mit Puffer A
- 5: Nach Elution von rekombinantem Galektin-1

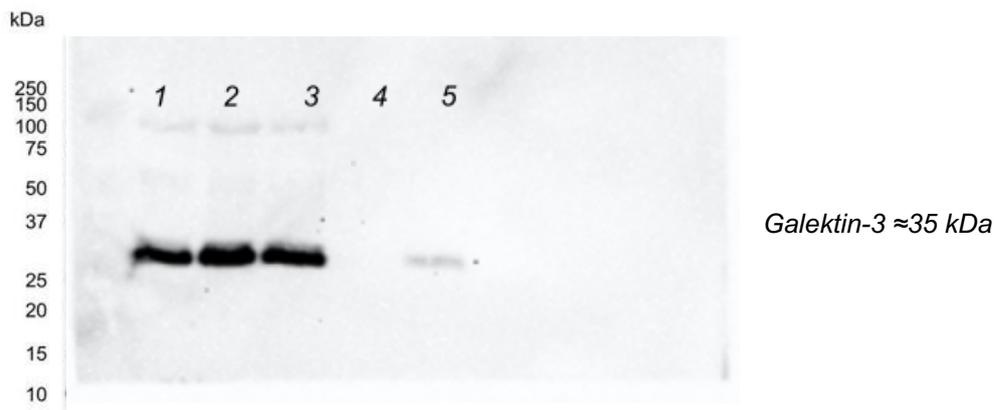


Abbildung 23: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression nach Chromatographie

- 1: Probe aus gesammeltem konditioniertem Medium Galektin-3
- 2: Probe konditioniertes Medium + Agarose nach Inkubation mit der α -Lactose-Agarose
- 3: 1. Probe aus dem Durchlauf nach dem Laden der α -Lactose-Agarose auf die Säule
- 4: 2. Probe aus dem Erlenmeyerkolben nach dreimaligem Waschen mit Puffer A
- 5: Nach Elution von rekombinantem Galektin-3

4.5.2 Selbst synthetisierte Epoxy-activated β -Lactose Agarose, Aminophenyl β - Lactose Agarose Beads

Der Vorgang der Affinitätschromatographie wurde erneut zwei Mal je für konditioniertes Medium mit rekombinantem Galektin-1 und Galektin-3 durchgeführt und wie unter 4.5.1 mit Hilfe von Probengewinnung und Western Blot Analyse ausgewertet. Es wurde statt Alpha-Lactose Agarose einmal die selbst hergestellte Epoxy activated β -Lactose Agarose verwendet und einmal die konventionellen Aminophenyl β - Lactose Agarose Beads.

Es zeigte sich beide Male die gleiche Bandenverteilung wie auch schon zuvor bei den konventionellen α -Lactose Beads (siehe Abbildung 22 und 23). Es zeigte sich ein deutliches Signal für Galektin im konditionierten Medium, sowie ein leicht abgeschwächtes Signal nach Inkubation mit der selbst synthetisierten Agarose, bzw. den Aminophenyl Agarose (Abbildung 24). Das Signal nach dem Laden der Agarose auf die Säule war vergleichbar stark wie nach der Inkubation. Kein Signal zeigte sich nach den Waschrissen sowie nach Elution.

Somit tritt auch bei Verwendung der selbst synthetisierten, sowie der konventionellen β -Lactose Agarose der größte Teil des Galektins nicht an die Lactose gebunden hat. Zur Veranschaulichung vergleiche Abbildung 24, welche anhand eines Beispiels einer Chromatographie durchgeführt mit Galektin-3 die erhaltene Bandenbildung aller durchgeführten Western Blots darstellt.

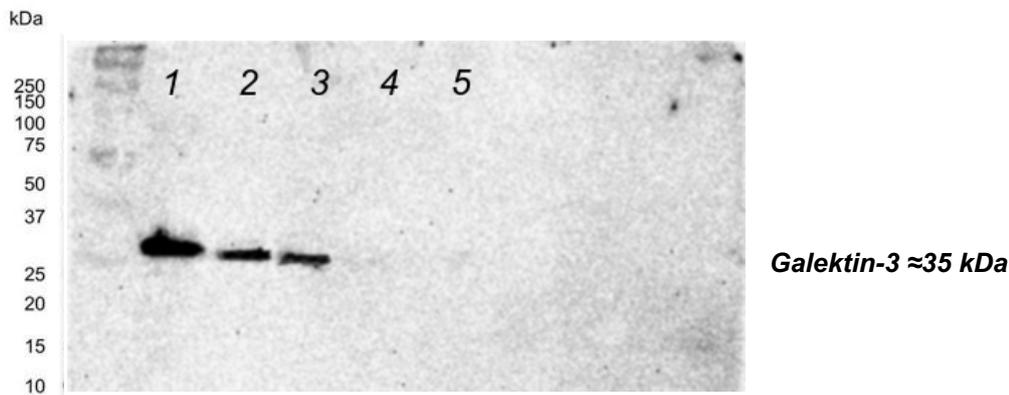


Abbildung 24: Western Blot für Galektin-1 nach Affinitätschromatographie mit selbst synthetisierter und konventioneller Aminophenyl beta-lactose Agarose

- 1: Probe aus gesammeltem konditioniertem mit rekombinantem Galektin-3
- 2: Probe konditioniertes Medium + Agarose nach Inkubation der Agarose
- 3: 1. Probe aus dem Durchlauf nach dem Laden der Agarose auf die Säule
- 4: 2. Probe aus dem Durchlauf nach dreimaligem Waschen
- 5: Probe nach Elution von rekombinantem Galektin-3

4.5.3 Variationen der Versuchsdurchführung

Affinitätschromatographie zur Proteinisolation

4.5.3.1 Inkubation der Suspension für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Inkubation über Nacht

Um die Bindung zwischen der konventionellen Aminophenyl-beta Lactose Agarose und den Zielproteinen im konditionierten Medium zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit der Suspension aus Aminophenyl β -Lactose Agarose und konditioniertem Medium zum einen auf 2 Stunden bei Raumtemperatur erhöht und zum anderen über Nacht durchgeführt. Die Probenladung in des SDS-Gels war dieselbe wie bereits unter 4.5.1 beschrieben. In der Western Blot Analyse zeigte sich ein Signal beim konditionierten Medium sowie ein leicht abgeschwächtes Signal nach Inkubation und nach dem ersten Durchlauf durch

die Chromatographiesäule (siehe Abbildung 25). Kein Signal für Galektin fand sich nach dem Waschen oder nach der Elution. Dies zeigt den Verlust der Galektine direkt nach dem Laden auf die Säule. Die Verlängerung der Inkubationszeit konnte somit nicht zu einer verbesserten Affinität zwischen Agarose und dem Zielprotein Galektin führen.

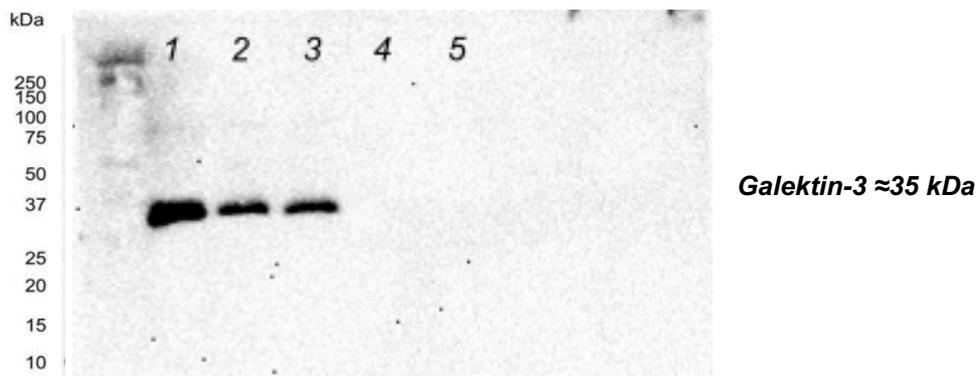


Abbildung 25: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression nach Chromatographie mit Verlängerung der Inkubation auf 2 Stunden über Nacht

- 1: Probe aus gesammeltem konditioniertem Medium Galektin-3
- 2: Probe konditioniertes Medium nach Inkubation der Aminophenyl β -Agarose
- 3: 1. Probe aus dem Durchlauf nach dem Laden der Agarose auf die Säule
- 4: 2. Probe aus dem Erlenmeyerkolben nach dreimaligem Waschen mit Puffer A
- 5: Probe nach Elution von rekombinantem Galektin-3

4.5.3.2 Chromatographie mit bereits isoliertem Galektin

Um die Säule und unserer konventionell erworbenen Aminophenyl β -Lactose Agarose im Allgemeinen auf ihre Fähigkeit der Bindung und Isolation von Galektin (in unserem Fall in dieser Versuchsdurchführung Galektin-1) zu testen, wurde bereits isoliertes Galektin mit der Agarose inkubiert und auf die Chromatographiesäule gegeben. Es zeigte sich eine besonders intensive und breite Bandenbildung in der Western Blot Analyse, was durch die hohe Konzentration an verwendetem Galektin-1 zu erklären ist (Abbildung 26). Es zeigte sich eine abgeschwächte Bande nach Inkubation mit der Agarose, sowie nach dem ersten Durchlauf. Keine Bande ist nach den Waschdurchläufen oder nach der Elution zu erkennen. Dies zeigt, dass das gesamte Galektin durch die

Säule hindurch in den Erlenmeyerkolben gelangt. Somit ist die Aminophenyl β -Agarose nicht in der Lage, Galektin zu binden.

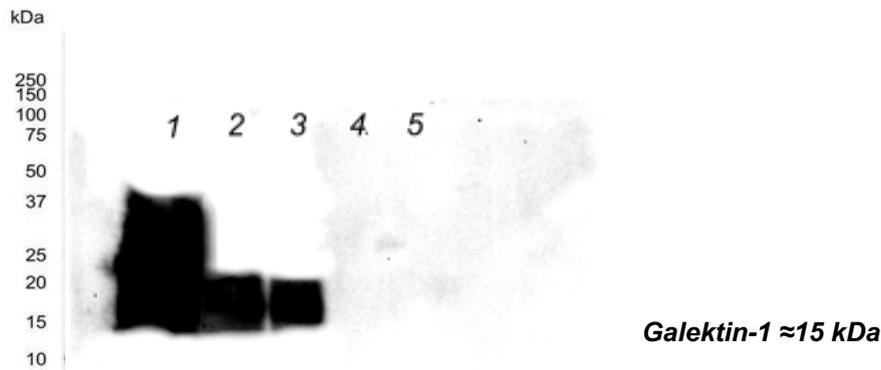


Abbildung 26: Western Blot Analyse nach Affinitätschromatographie mit bereits konzentriertem Galektin-1

- 1: Probe aus isoliertem Galektin-1 (Zur Verfügung gestellt aus dem Helmholtz Zentrum München)
- 2: Probe Galektin-1 + Agarose nach Inkubationszeit der Agarose von 30 Minuten
- 3: 1. Probe aus dem Durchlauf nach dem Laden der Agarose auf die Chromatographiesäule
- 4: 2. Probe aus dem Erlenmeyerkolben nach dreimaligem Waschen mit dem Puffer A
- 5: Probe nach Elution von Galektin-1

4.5.4 Chromatographie durch Zentrifugation ohne Säule

Nachdem die Chromatographie mit der Chromatographiesäule nicht zum erwünschten Erfolg geführt hat, wird die Versuchsdurchführung der Proteinisolation mit den gleichen Puffern, wie auch bei der Versuchsdurchführung mit der Säule, diesmal ohne eine Säule durchgeführt. Stattdessen wird das Pellet aus Agarose vom Puffer durch Zentrifugation in einem Zentrifugationsröhrchen getrennt.

Der Versuch wurde mit Galektin-1 und Galektin-3 konditioniertem Medium durchgeführt, das Ergebnis ergab bei beiden Galektinen die gleiche Bandenverteilung. Das Ergebnis ist anhand der Western Blot Analyse von Galektin-3 dargestellt (Abbildung 27). Es zeigte sich eine deutliche Bandenbildung und somit Galektin-3 Expression in den Proben des konditionierten Mediums, im konditionierten Medium nach Inkubation mit der Agarose und im Überstand des Zentrifugationsgefäßes nach der ersten Zentrifugation und vor dem ersten Waschen der Agarose mit dem Puffer A. Keine

Banden zeigten sich im Überstand nach dem ersten Waschen und insbesondere nicht in der relevanten Probe, die das eluierte Galektin-3 enthalten sollte. Somit hat auch die Affinitätschromatographie ohne Chromatographiesäule nicht zum gewünschten Ziel geführt, dass rekombinante Galektin aus dem konditionierten Medium isolieren zu können.

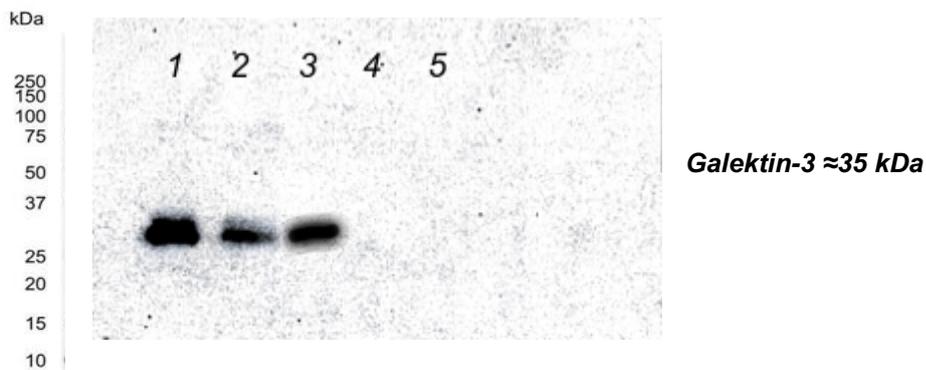


Abbildung 27: Western Blot Analyse Galektin-3 nach Proteinisolation mit Zentrifugation

- 1: Probe aus gesammeltem konditioniertem Medium mit rekombinantem Galektin-3
- 2: Probe aus konditioniertem Medium und Agarose nach Inkubation
- 3: 1. Probe aus dem Zentrifugationsgefäß vom Überstand nach erster Zentrifugation
- 4: 2. Probe aus dem Zentrifugenröhrchen Überstand nach Waschen mit dem Puffer A
- 5: Eluiertes Galektin-3

4.6 Konzentrierung von Galektin aus konditioniertem Medium

4.6.1 Konzentrierung von Galektin-1 aus konditionierten LGALS-1 Medium

Zur Konzentrierung von rekombinantem Galektin-1 aus dem gesammelten konditionierten Medium wurde ein Konzentrator mit einem Molecular weight cut-off (MWCO) von 12 kDa verwendet (vergleiche 3.6.2). Der MWCO gibt an, bis zu welcher spezifischen Größe Moleküle von der Membran zurückgehalten werden. Durch diesen Konzentrator mit spezifischen Poren ist es möglich, Proteine die kleiner sind als Galektin-1 mit einem Molekulargewicht von 15 kDa, zu entfernen. Es wurde eine Western Blot Analyse mit drei Proben durchgeführt, die je vor und nach der Zentrifugation, sowie aus dem Überstand unterhalb der Membran, entnommen wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Signalverstärkung vom Zeitpunkt vor zu nach der Zentrifugation.

Dies lässt darauf schließen, dass durch den Ausschluss der kleineren Proteine unter 12 kDa, eine Anreicherung des Galektins aus dem konditionierten Medium stattgefunden hat. An dritter Stelle, welches die Probe unter der Membran nach Zentrifugation darstellt, lässt sich in der Western Blot Analyse keine Galektin-1 Expression nachweisen (Vergleiche Abbildung 28). Dies zeigt, dass das rekombinante Galekin-1 die Membran nicht passieren kann.

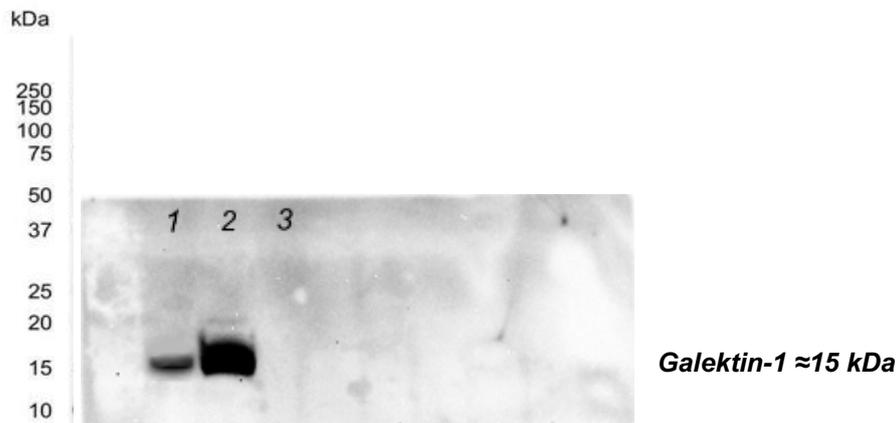


Abbildung 28: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Vivaspin 2 Centrifugator Concentrator (MWCO: 12 kDa)

- 1: Konditioniertes Medium Galektin-1 vor Konzentrierung
- 2: Probe aus gesammelter Lösung nach Konzentration mit dem Konzentrator
- 3: Probe Überstand nach Zentrifugation mit dem Konzentrator unterhalb der Membran

Im nächsten Schritt sollten auch die Proteine, die größer sind als Galektin-1 entfernt werden. Hierfür wurde erneut eine Probe aus konditioniertem Medium mit rekombinanten Galektin-1 entnommen, welches vorher auf die Expression des Proteins getestet wurde. Das konditionierte Medium wurde in den Zentrifugalkonzentrator mit einem MWCO Wert von 30 kDa gegeben. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt. Es zeigte sich eine Galektin-1 Expression im konditionierten Medium, sowie oberhalb der Membran. Kein Signal hingegen war in der Probe aus dem Durchlauf unterhalb der Membran zu erkennen. Das Ergebnis der Banden im Western Blot zeigte, dass das rekombinante Galektin-1 nicht durch die vertikale Membran gelangen konnte und sich oberhalb der Membran gesammelt hat. Der Versuch wurde mehrmals mit verschiedenen Proben aus gesammeltem konditioniertem Medium wiederholt und zeigte stets die gleiche Bandenverteilung in der Western Blot Auswertung.

Eine Aufreinigung des konditionierten Mediums mit Galektin-1 durch Ausschluss der Proteine größer als 30 kDa war somit mit dem Pierce Protein Konzentrator nicht möglich.

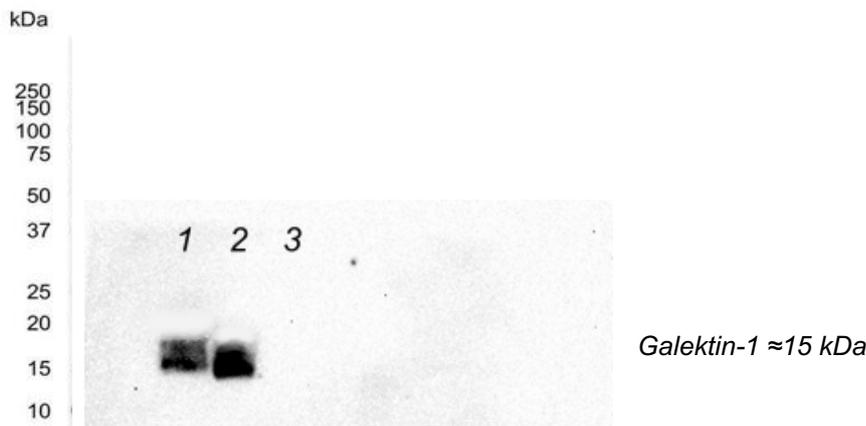


Abbildung 29: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Pierce Protein Konzentrators, MWCO 30 kDa

- 1: Konditioniertes Medium Galektin-1 vor Konzentrierung
- 2: Probe nach Zentrifugation oberhalb der vertikalen Membran
- 3: Probe Durchlauf unterhalb der Membran nach Zentrifugation mit dem Konzentrator

4.6.2 Konzentrierung Galektin-3 aus konditionierten LGALS-3 Medium

Um rekombinantes Galektin-3 aus dem gesammelten konditionierten Medium zu isolieren, wurde zunächst ein Konzentrator mit einem Cut-off Wert von 30 kDa genutzt, um kleinere Proteine auszuschließen. Es wurden für die Western Blot Analyse Proben aus dem konditionierten Medium sowie aus dem Konzentrator nach Zentrifugation über und unterhalb der vertikalen Membran entnommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt.

Wie bereits beim Versuch mit rekombinanten Galektin-1, zeigte sich eine deutliche Signalverstärkung der Bande nach der Zentrifugation, was für einen erhöhten Anteil an konzentriertem Galektin-3 spricht.

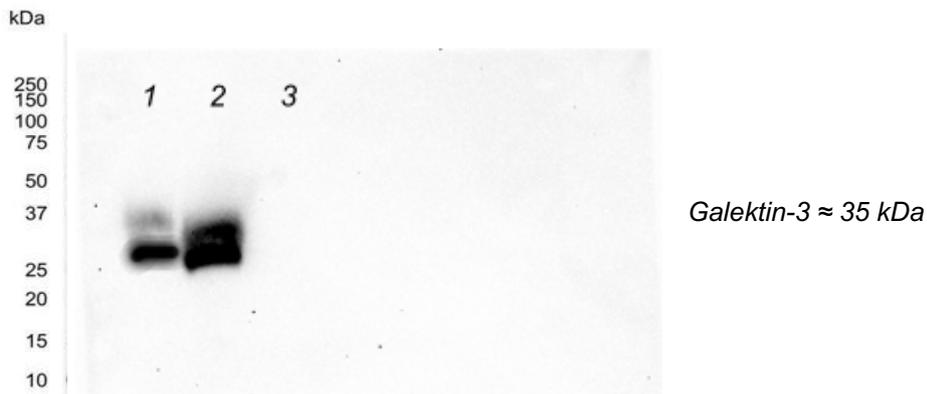


Abbildung 30: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Pierce Protein Konzentrator (MWCO: 30 kDa)

- 1: Gesammeltes konditioniertes Medium mit rekombinantem Galektin-3
- 2: Probe nach Zentrifugation mit dem Konzentrator, oberhalb der Membran
- 3: Probe Durchlauf, nach Zentrifugation mit dem Konzentrator, unterhalb der Membran

Um Galektin-3 weiter zu isolieren, mussten auch größere Proteine entfernt werden. Hierfür wurde ein Zentrifugalkonzentrator mit einem Cut-off Wert von 50 kDa verwendet (vergleiche 3.6.2). Es wurden zur Kontrolle der Isolation Proben für eine Western Blot Analyse entnommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt.

Wie bereits bei Galektin-1, zeigte sich eine Galektin-3 Expression im konditionierten Medium und oberhalb der vertikalen Membran nach Zentrifugation mit dem Proteinkonzentrator. In der Probe aus dem Durchlauf unterhalb der vertikalen Membran, zeigte sich kein Signal für Galektin-3. Rekombinantes Galektin-3, welches mit einem Molekulargewicht von 35 kDa die Poren der PES Membran passieren sollte, sammelt sich stattdessen oberhalb der Membran an. Der Versuch wurde dreimal mit unterschiedlichem gesammeltem konditioniertem Medium wiederholt und zeigte stets die gleiche Verteilung von Galektin-3 in der Western Blot Analyse. Eine Isolierung des rekombinanten Galektin-3 aus dem konditionierten Medium durch Ausschluss größerer Proteine mit Hilfe des Protein Zentrifugalkonzentrators von Pierce ist somit nicht möglich.

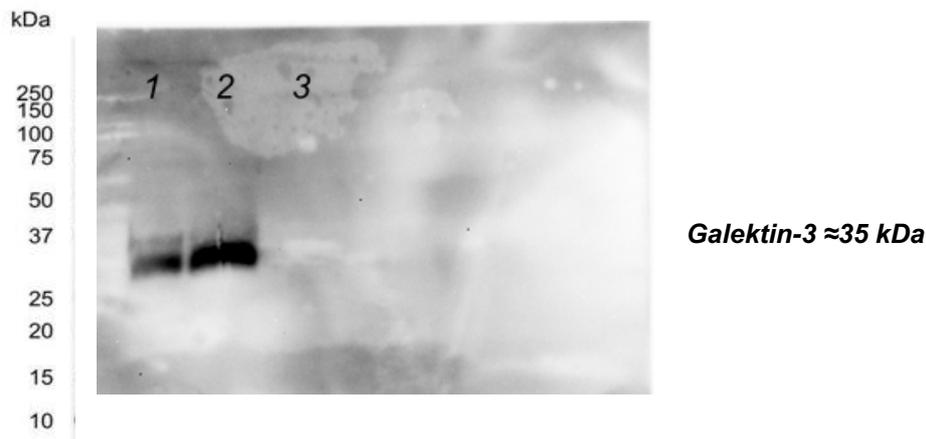


Abbildung 31: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Pierce Protein Konzentrator (MWCO: 50 kDa)

- 1: Gesammeltes konditioniertes Medium mit rekombinantem Galektin-3
- 2: Probe nach Zentrifugation mit dem Konzentrator, oberhalb der Membran
- 3: Probe nach Zentrifugation, aus dem Durchlauf unterhalb der Membran

4.7 Dialyse des konditionierten Mediums

Da die Isolation des rekombinanten Galektins in den bereits durchgeführten Versuchen der Affinitätschromatographie und der Proteinisolation mit Zentrifugalkonzentratoren nicht vollständig gelungen war, wurde die Methode der Proteindialyse zur Aufreinigung des konditionierten Mediums angewandt. Der Versuch sollte insbesondere dazu dienen, dass konditionierte Medium von Proteinen größer als Galektin-1 und -3 zu reinigen, da mit den Zentrifugalkonzentratoren nur eine Isolation von kleineren Proteinen möglich war (vergleiche 4.6.2).

Während der zweifachen Dialyse mit je unterschiedlichen Dialyseschläuchen und der anschließenden Konzentrierung des konditionierten Mediums im Zentrifugalkonzentrator, wurden stetig nach jedem Schritt Proben zur Kontrolle der Galektin Konzentration entnommen. Der Versuch wurde durch eine Western Blot Analyse ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt.

4.7.1 Dialyse des konditionierten Mediums mit rekombinantem Galektin-1

Um das konditionierte Medium mit rekombinantem Galektin-1 zunächst von allen kleineren Proteinen zu trennen, wurde der Dialyseschlauch mit einem MWCO von 14 kDa gewählt. Hier zeigte sich ein Signal in der Western Blot Analyse für Galektin-1 im gesammelten konditionierten Medium. Dieses Signal zeigte sich verstärkt in der Probe nach der Dialyse und Inkubation über Nacht (Abbildung 32). Kein Signal für Galektin-1 zeigte sich in der Probe außerhalb der Dialyseschlauchs. Dies zeigte, dass das rekombinante Galektin-1 mit seiner Größe von 15 kDa nicht in der Lage ist, die Poren der Dialysemembran zu durchschreiten und innerhalb des Schlauchs verbleibt und dadurch konzentriert wird.

Um das rekombinante Galektin-1 weiter zu isolieren, wurde im nächsten Schritt die Dialysemembran mit einem MWCO von 50 kDa verwendet. Hiermit sollte ein Großteil der größeren Proteine entfernt werden. Das Ergebnis der zweiten Dialyse ist in der Western Blot Analyse durch die Banden 4 und 5 dargestellt (Abbildung 32). Es zeigte sich eine ebenso starke Bande in der Western Blot Analyse für die Probe aus dem zweiten Dialyseschlauch, wie in der Probe aus dem ersten Schlauch. Kein Signal war hingegen außerhalb der Membran zu detektieren. Ebenso ist kein Signal in der anschließenden Konzentrierung des Dialysats mit dem Konzentrator zu erkennen (Abbildung 32).

Galektin-1 hat ein Molekulargewicht von circa 15 kDa und sollte somit die Poren der Dialysemembran passieren können, währenddessen Proteine größer als 50 kDa im Schlauch festgehalten werden.

Das Versuchsergebnis zeigte, dass die kleineren Proteine durch die Dialyse, wie auch schon im Versuch mit den Zentrifugalkonzentrator (vergleiche Ergebnisse 4.6.1), entfernt werden können und zu einer Konzentrierung von rekombinanten Galektin-1 im gesammelten konditionierten Medium führte. Nicht möglich ist die Trennung des rekombinanten Mediums von Proteinen, die ein größeres Molekulargewicht haben als das rekombinante Galektin, da es während der zweiten Dialyse mit allen größeren Proteinen innerhalb des Dialyseschlauchs verbleibt.

Somit führt die verwendete Dialysedurchführung mit den vorhandenen konventionellen Dialyseschläuchen nicht zum gewünschten Erfolg der Proteinaufreinigung.

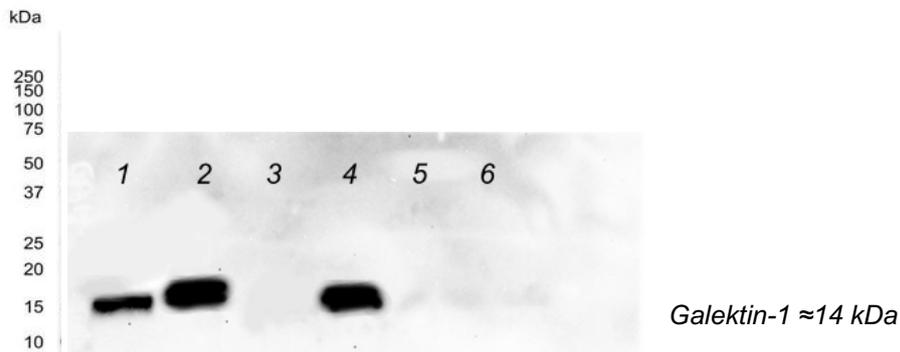


Abbildung 32: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit zweifacher Dialyse und Zentrifugation mit dem Proteinkonzentrator

- 1: Probe konditioniertes Medium mit rekombinalem Galektin-1
- 2: Probe aus Dialyseschlauch, MWVO: 14 kDa
- 3: Probe aus dem Erlenmeyerkolben nach erster Dialyse (mit 14 kDa Schlauch)
- 4: Probe aus Dialyseschlauch, MWVO: 50 kDa
- 5: Probe aus dem Erlenmeyerkolben nach zweiter Dialyse (mit 50 kDa Schlauch)
- 6: Probe nach Zentrifugation mit dem Proteinkonzentrator (MWCO: 12 kDa), oberhalb der Membran

4.7.2 Dialyse des konditionierten Galektin-3 Medium

Wie schon für rekombinantes Galektin-1 unter 4.7.1 beschrieben, versuchte man mit der Dialyse des gesammelten konditionierten Mediums mit rekombinatem Galektin-3, zunächst alle kleineren Proteine aus dem Medium zu entfernen. Hierfür wurde eine zweischrittige Dialyse durchgeführt. Die erste Dialyse des konditionierten Mediums erfolgte mit einem Dialyseschlauch mit einem Cut-off Wert von 14 kDa, die zweite Dialyse mit einem Schlauch mit einem Cut-off Wert von 50 kDa. Um anschließend das im Dialysat vorhandene Galektin-3 wieder zu konzentrieren, wurde dieses in einen Proteinkonzentrator mit einem Cut-off Wert von 30 kDa gegeben.

Es zeigte sich in der Auswertung der Western Blot Analyse auf die Expression von Galektin-3 ein Signal aus der Probe des konditionierten Mediums, sowie ein leicht verstärktes Signal im Dialyseschlauch mit einem Cut-off von 14 kDa nach der Dialyse über Nacht (Abbildung 33). Im Dialysat außerhalb des Schlauches

zeigte sich hingegen kein Galektin-3. Nach der zweiten Dialyse mit dem Dialyseschlauch mit einem Cut-off Wert von 50 kDa zeigte sich ebenfalls ein Signal aus der Probe des Dialyseschlauches, aber nicht aus der Probe im Dialysat (Abbildung 33). Somit zeigte sich auch kein Signal für Galektin-3 nach der Konzentrierung des Dialysats im Proteinkonzentrator.

Das Ergebnis der Bandenverteilung lässt sich auf dieselbe Weise, wie bereits für Galektin-1 beschrieben, interpretieren. Galektin-3 verblieb während der ersten Dialyse im Dialyseschlauch, da es mit einem Molekulargewicht von 34 kDa nicht in der Lage ist, die Poren mit einer Größe von 14 kDa zu durchdringen (vergleiche zweite Bande Abbildung 40). Das Ergebnis der zweiten Dialyse zeigt, dass das rekombinante Galektin-3 nicht in der Lage ist, den zweiten Dialyseschlauch mit einem Cut-off Wert von 50 kDa zu passieren. Da das rekombinante Galektin den Schlauch nicht passiert hat, kann es nach der Dialyse auch nicht durch den Proteinkonzentrator aufgereinigt und isoliert werden.

Zusammenfassend ist die Dialyse mit dem verwendeten konventionellen Dialyseschlauch für das rekombinante Galektin-3 nicht die geeignete Methode, um es von größeren Proteinen zu isolieren.

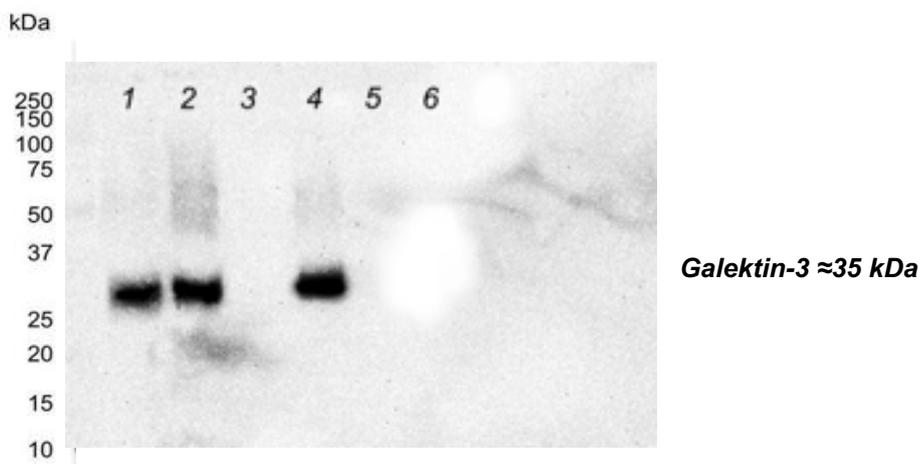


Abbildung 33: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit zweifacher Dialyse und Zentrifugation mit

- 1: Probe konditioniertes Medium mit rekombinantem Galektin-3
- 2: Probe aus Dialyseschlauch mit einem Cut-off Wert von 14 kDa
- 3: Probe aus dem Dialysat nach erster Dialyse (mit 14 kDa Schlauch)
- 4: Probe aus Dialyseschlauch mit Cut-off Wert von 50 kDa
- 5: Probe aus dem Dialysat nach zweiter Dialyse (mit 50 kDa Schlauch)

-
- 6: *Probe konzentriertes Galektin-3 nach Zentrifugation mit dem Proteinkonzentrator
(Cut off des Konzentrator: 30 kDA)*

5. Diskussion

Galektine sind Schlüsselproteine in der inter- und intra- zellulären Kommunikation und greifen in Prozesse wie die Zell zu Zell Kommunikation, Proliferation und Migration ein. Diese Prozesse stellen ebenfalls einen Bestandteil der proliferativen Vitreoretinopathie dar (23). Es konnte ein negativ proliferativer und adhäsiver Effekt der Galektine auf die retinalen Pigmentepithelzellen nachgewiesen werden (122-125), der zukünftig therapeutisch oder zur Prophylaxe der PVR genutzt werden könnte. Bislang sind die Wirkungs- und Synthesemöglichkeiten der Galektine noch nicht ausreichend erforscht, um Sie therapeutisch in vivo einsetzen zu können.

Diese laborexperimentelle Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von durch Transfektion exprimierter rekombinanter Proteine Galektin-1 und Galektin-3. Die rekombinanten Galektine konnte durch Western Blot Analysen im gesammelten konditioniertem Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten die rekombinanten Proteine deutliche Hinweise auf eine Bioaktivität auf retinale Pigmentepithelzellen in vitro, ohne erkennbare Zytotoxizität. So wiesen die Galektine eine hoch signifikante Hemmung auf die Adhäsion der retinalen Pigmentepithelzellen auf. Bezüglich des Einflusses von Galektin-1 und -3 auf die Proliferation zeigte sich ein ambivalentes Bild. So zeigte die Behandlung von mikrovaskulären Endothelzellen mit Galektin-1 eine signifikante Steigerung der Proliferation, wohingegen nach der Inkubation von immortalisierten RPE-Zellen mit beiden Galektinen lediglich einen Trend zur vermehrten Zellteilung zu beobachten war.

Die Isolation der Galektine aus dem konditionierten Medium wurde mit verschiedenen Verfahren versucht. Eine Proteinkonzentration mit einem Zentrifugalkonzentrator führte zu einer Erhöhung der Galektinkonzentration. Allerdings führten weder Affinitätschromatographie, noch Proteinkonzentration durch Zentrifugation, noch eine Proteindialyse zur gewünschten Isolation der Galektine aus dem konditionierten Medium.

5.1 Synthese rekombinanter Galektine durch Transfektion

Ziel meiner Laborexperimentellen Arbeit war es, Galektin-1 und Galektin-3 durch den Vorgang der Transfektion mit Hilfe von Plasmid-DNA in Kultur in Eukaryoten

Zellen zu exprimieren. Die Transfektion ist ein äußerst komplexer Vorgang. Die Aufnahme der DNA allein, setzt auch noch keine erfolgreiche Proteinproduktion voraus. Ziel war es, dass die transfizierten Zellen Galektin-1 und Galektin-3 produzieren und in der Lage sind, diese in das Zellkulturmedium abzugeben. Wir kontrollierten die Synthese, in dem wir das Zellkulturmedium von transfizierten und nicht transfizierten Zellkulturlinien sammelten, um anschließend Proben für eine Western Blot Analyse zu entnehmen. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Bandenbildung und somit Galektin-1 sowie auch Galektin-3 Expression (vergleiche Ergebnisse 3 4.2). Die anschließende Selektion mit Hygromycin diente der Auswahl und Weiterzucht einer Zellkulturlinie, bei der nur Zellen überleben, die mit der Plasmid-DNA transfiziert waren. Beide Vorgänge, sowohl Transfektion wie auch Selektion stellten sich als erfolgreich heraus und waren ein wichtiger Grundstein, um mit den weiteren Experimenten sowie der Testung und Isolation der Proteine fortzufahren.

5.2 Nachweis der Bioaktivität von rekombinantem Galektin-1 und -3 hemmen in konditioniertem Zellkulturmedium

Um die Aktivität der Galektine auf retinale Pigmentepithelzellen zu testen, wurden ARPE-19 Zelllinien genutzt. Diese Zelllinie stammt von einem karyotypisch gesunden jungen Mann, somit sind die Ergebnisse gut mit der in vivo Situation eines normale Auges vergleichbar (144).

In unserem Versuch werden rekombinante Galektine nach erfolgreicher Transfektion in das Zellkulturmedium abgegeben. Sowohl Galektin-1 wie auch Galektin-3 konnten mittels Western Blot Analyse im konditionierten Medium nachgewiesen werden. Aus bereits bestehenden veröffentlichten Arbeiten ist die Wirkung von Galektin-1 und -3 auf ARPE-19 Zellen bekannt (145). So konnten bisherige Studien bereits einen antiproliferativen und antiadhäsiven Effekt der Proteine auf ARPE-19 Zellen in vitro nachweisen (122, 123, 145). Unsere Versuche konnten den bereits bekannten bioaktiven Effekt der Galektine auf die Adhäsion bestätigen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Wirkung der rekombinanten Galektine nur im konditionierten Medium getestet werden konnte, nicht aber in isolierter, aufgereinigter Form. Hiermit geht der Nachteil einher, dass sich im konditionierten Medium zusätzlich eine Reihe von anderen gelösten und potenziell toxischen Substanzen befindet. Um den Effekt der Galektine vom

konditionierten Medium zu unterscheiden, wurde stets eine Kontrolle mit konditioniertem Medium verwendet, welches unter denselben Bedingungen gewonnen und gelagert wurde, wie das Galektin-haltige Medium. Die Höhe der Konzentration der Galektine im gesammelten Medium ist abhängig von der Anzahl der kultivierten und transfizierten Zellen, die das Galektin in das Medium sezernieren. Deshalb wurde stets auf eine vergleichbare Zelldichte geachtet. Trotzdem lässt sich die bioaktive Wirkung der rekombinanten Galektine und das Ergebnis unserer Versuche mit dem bereits bestehenden Wissensstand über die Wirkung von Galektin-1 und Galektin-3 vergleichen und stimmt mit diesem überein.

So konnte eine andere Studie bereits eine Beeinflussung der Adhäsion von Photorezeptoren und den plexiformen Schichten der Retina durch Galektin-1 zeigen, sowie eine anti-apoptotische Wirkung von Galektin-3 auf die Müller Zellen im Tierversuch (146).

5.2.1 Galektin und die Hemmung der Adhäsion von RPE-Zellen

In unserer Testung der Bioaktivität der rekombinanten Galektine haben wir insbesondere auch die Beeinflussung der Adhäsion beobachtet, ein entscheidender mitwirkender Prozess in der Pathogenese der proliferativen Vitreoretinopathie darstellt (125). Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen an konditioniertem Medium gewählt, um eine Dosisabhängigkeit feststellen zu können. Unsere Versuchsdurchführung beruht dabei auf Versuchsergebnissen, die bereits gezeigt haben, dass Galektin-1 und Galektin-3 an die Zelloberfläche der RPE Zellen binden können und dadurch in der Lage sind, die Adhäsion, Migration und Ausbreitung zu verhindern (125, 126). Unsere Frage war nun, nach Nachweis der rekombinanten Galektine im konditionierten Medium (vergleiche 4.2), ob diese Galektine nach ihrer transgenen Expression auch eine Bioaktivität besitzen.

Das Ergebnis zeigte eine signifikante Inhibierung der Adhäsion ARPE-19 Zellen nach dem Aussäen. Die Adhäsion konnte in der von uns gewählten Konzentration um bis zu 43 % gesenkt werden (vergleiche 4.4.1). Um sicherzustellen, dass die Galektine und nicht andere Moleküle im gesammelten konditionierten Medium zu diesen Effekten geführt haben, verwendeten wir eine Kontrolle mit gleichbehandeltem Medium, dass durch nicht transfizierten Zellkulturen konditioniert

wurde. Unsere Versuche zeigten außerdem den Trend, dass die Adhäsion Konzentrations abhängig gehemmt wurde. Mit einer in unserem Fall verwendeten verdoppelten Konzentration an konditioniertem Medium, konnte die Adhäsion um 11 % stärker gehemmt werden. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die neu synthetisierten rekombinanten Galektine 1- und -3 ebenfalls einen inhibierenden adhäsiven Effekt haben, wie bereits auch die Galektine in den bisherigen Studien (125, 126). Im Gegensatz hierzu zeigte das gesammelte konditionierte Medium allein keinen antiadhäsiven Effekt. Aus den bisherigen Studien ist bereits bekannt, dass Galektin-1 und -3 über ihre spezifische Carbohydratbindungsstruktur an die RPE Zellen bindet. Dies geschieht über eine Clustering des platled-derived growth factor β (PDGF) und den low-density lipoprotein receptor LRP sowie Integrin β . Dies induziert wiederum eine Aktivierung des ERK/MAPK und des AKT Signalweges (122). Der ERK/MAPK Signalweg stellt einen entscheidenden Schritt für die RPE Zell Adhäsion und Proliferation dar. Aus bisheriger Forschung ist bekannt, dass die Adhäsion der RPE-Zellen nach carbohydrateabhängiger Bindung von Galektin-3, durch eine veränderte Mikrofilamentanordnung und eine hierdurch reduzierte ERK Phosphorylierung gehemmt werden kann (126)

Allerdings kommen auch weitere Bindungspartner und somit andere Signalwege für die Wirkung der Galektine in Betracht, die bislang noch nicht genau erforscht wurden. So ist bekannt, dass die Affinität der Proteine zu ihren Liganden ebenfalls von verschiedensten Umgebungsfaktoren und ihrer Präsentation abhängig ist (147). Es konnten bereits für Galektin-1 15 und für Galektin-3 131 Bindungsstrukturen auf den retinalen Pigmentepithelzellen gefunden werden (122) Dies verdeutlicht die Komplexität der carbohydrateabhängigen Ligandenbindung und Interaktion.

Unser Ergebnis ist somit vereinbar mit der bereits bestehenden Literatur und den bisherigen Studien, die sich mit dem Einfluss von Galektin-1 und Galektin-3 auf die Adhäsion im Kontext der PVR beschäftigt haben.

5.2.2 Galektin und der Einfluss auf die Proliferation

Galektine können je nach Umgebung unterschiedliche Eigenschaften annehmen (vergleiche 1.2.2). Eine Studie zur altersbedingten Makuladegeneration, die den Einfluss von Galektin-1 auf RPE Zellen getestet hatte, zeigte einen pro

fibrotischen und proliferativen Effekt auf die Gefäßbildung, durch eine VEGF-Rezeptorstimulation (96). Durch diese Rezeptorstimulation können Galektin-1 auch an der Pathogenese der proliferativen diabetischen Retinopathie beteiligt sein (97). Eine weitere Studie zeigte einen direkten Zusammenhang, zwischen einer Galektin-1 Überexpression und einer Neovaskularisation der Retina (148). Auch andere Studien zeigten bereits den pro-fibrotischen und somit proliferativen Effekt von Galektin-1, insbesondere im Kontext von Tumoren (149). Auch für Galektin-3 konnte dieser proliferative Effekt in Hinblick auf die Angiogenese bei Tumoren beobachtet werden (150). Galektin-3 spielt auch eine Rolle in profibrotischen Prozessen, insbesondere in Entzündungsreaktionen, indem es die Fibroblasten und Macrophagenaktivierung beeinflusst und somit neben Fibrose auch die Narbenbildung fördert (72).

Allerdings zeigen andere Studien, die sich mit dem Einfluss von Galektinen auf eine PVR befassen, dass die Ausbreitung und Migration, der durch die EMT transformierten RPE-Zellen, durch Galektine in vitro gehemmt werden kann (123, 125, 126).

An diesen Zellen konnte eine Mikrofilamentveränderung der RPE Zellen durch die Bindung von Galektin-3 und damit eine Minderung der Zellkontakte und Migration nachgewiesen werden (126). Insbesondere konnten die Studien zeigen, dass Galektin-3 Karbohydrat abhängig an myofibroblastische RPE Zellen binden kann, wie sie nach der EMT in der PVR zu finden sind, und somit ihre Ausbreitung verhindern kann. Außerdem zeigten die RPE Zellen durch ihre Transformation eine erhöhte Empfänglichkeit für die Galektinbindung (151).

Da der Einfluss der Proliferation der RPE- Zellen, neben der EMT und der Migration ein wichtiger Pathogenitätsfaktor der PVR darstellt (23), könnte eine potentielle antiproliferative Wirkung der synthetisierten rekombinanten Galektine eine wichtige therapeutische Option darstellen. Diese Wirkung ist bereits in Studien mit humanem rekombinanten Galektin nachgewiesen worden (126, 151). Daher haben wir in unseren Versuchen ebenfalls die von uns neu synthetisierten rekombinanten Galektine auf ihre proliferative Wirkung auf RPE und auch auf HUVEC Zellen getestet. Zur Vergleichbarkeit wurde eine Kontrolle aus konditioniertem Medium nicht transfizierter Ziellinien verwendet, welches dieselbe Lagerungszeit wie das Testmedium hatte. Es ist zu beachten, dass es

zu konträrer Wirkung der Galektine bei starker Erhöhung der physiologischen Konzentration kommen kann.

5.2.2.1 Steigerung der Proliferation von RPE Zellen

Es wurde gesammeltes konditioniertes Medium mit Galektin-1 und Galektin-3 an kultivierten ARPE-19 Zellkulturen getestet. Die Auswertung der Proliferationsanalyse mit Hilfe einer ELISA Analyse zeigte eine leicht gesteigerte proliferative Wirkung der RPE-Zellen von 23,9 % unter dem Einfluss des konditionierten Mediums von Galektin-1 und von 29,3 % unter konditioniertem Medium von Galekin-3. Allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant (vergleiche 4.4.2), so dass für den Einfluss des rekombinanten Galektin-1 und -3 in konditioniertem Medium auf die Proliferation von ARPE-19 Zellen nur von einem Trend gesprochen werden kann.

Des weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass konditionierte Medium eine unterschiedliche hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren, beziehungsweise gelösten Stoffen enthält. So handelt es sich bei HEK Zellen um Tumorzellen und somit um eine hochproliferative Zelllinie, die eine Reihe von Wachstumsfaktoren sezernieren und in das konditionierte Medium abgeben. Dies wiederum kann die Wirkung der Proliferation in Kombination mit Galektinen im konditionierten Medium beeinflussen und gegebenenfalls auch zu konträren Ergebnissen führen. Es muss beachtet werden, dass nicht nur die Konzentration der Galektine im konditionierten Medium schwankt, sondern auch die enthaltenen Wachstumsfaktoren sowie potenziell gelöste toxische Substanzen, die die Proliferation negativ beeinflussen könnten. Die Konzentration dieser Faktoren könnte sich entscheidend zwischen dem Galekin- haltigem und Galektin-freien konditioniertem Medium unterscheiden. Somit ist es nicht möglich, den Effekt auf die Proliferation auf die RPE Zellen alleine auf das Anwesenheit des rekombinanten Galektins zurück zu führen.

Bei Betrachtung der Methoden muss des weiteren das Auszählen mit der Neubauerzählkammer (vergleiche 3.4.2) zur Vergleichbarkeit der wiederholten Versuchsdurchführung kritisch bewertet werden. Es könnte durch die Zellkonglomerat Bildung und eine unvollständige Lösung der Zellen zu einer gewissen Fehlerquote kommen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die stark schwankende und abweichende Standardabweichung sein (vergleiche

Ergebnisse 4.4.2). Allerdings wurde bei der Durchführung der Experimente darauf geachtet, dass die Zellen überwiegend einzeln vorlagen. Somit kann diese potenzielle Fehlerquelle als eher unwahrscheinlich erachtet werden.

Die Galektine liegen im gesammelten Medium nicht hochkonzentriert, sondern verdünnt vor. Daher sollte eine erneute Testung der Proliferation nach Isolation oder Konzentrierung der rekombinanten Galektin-1 und -3 aus dem konditionierten Medium unternommen werden.

5.2.2.2 Steigerung der Proliferation von HUVEC Zellen

Huvec Zellen wurden verwendet, um den Einfluss der Galektine auf die Proliferation der Endothelzellen zu testen. Vielzählige Studien für die unterschiedlichen Klassen der Galektine konnten bereits zeigen, dass die Proteine durch ihre Karbohydrat-bindenden Eigenschaften in viele verschiedene Zellprozesse eingreifen und somit auch verschiedenste Zellarten beeinflussen können (57). Somit ist es wichtig, auch die bioaktive Wirksamkeit der rekombinanten Galektine auf diverse Zellarten zu testen. Die Testung der Endothelzellen erfolgte, wie auch schon für die RPE Zellen, mit konditioniertem Medium mit Galektin-1 oder Galektin-3 und einem konditioniertem Kontrollmedium ohne Galektine.

Das Ergebnis ergab eine gesteigerte Proliferation der Endothelzellen unter dem Einfluss der Galektine (vergleiche 4.4.3). Unter Galektin-1 konnte die Proliferation um 89 % und mit Galektin-3 62,5 % im Vergleich zur Proliferation der Kontrolle gesteigert werden. Dieser Effekt zeigte sich in der statistischen Auswertung für Galektin-1 als signifikant, für Galektin-3 allerdings nicht.

Das Ergebnis ist somit vergleichbar mit den Ergebnissen des bisherigen Forschungsstandes, wo bereits gezeigt wurde, dass Galektine einen proliferativen Effekt haben können (vergleiche 5.2.2). So zeigten bisherige Studien, dass Galektin-3 Inhibitoren die Angiogenese und Migration von HUVEC Zellen hemmen konnte (152). Auch für Galektin-1 sind proliferative Effekte insbesondere in Bezug auf die Angiogenese der Endothelzellen bekannt (153).

Ebenfalls stimmt das Ergebnis der verwendeten rekombinanten Galektine mit dem bisherigen Forschungsstand mit isolierten Galektinen im Zusammenhang zur Prophylaxe der PVR überein (125, 126)

5.3 Isolation von rekombinanten Galektinen durch Affinitätschromatographie

Nachdem die Transfektion und Selektion der transfizierten Zellkulturen gelungen war und die Bioaktivität der Galektine nachgewiesen werden konnte, war der nächste Schritt die Isolation der Proteine aus dem gewonnen konditionierten Medium. Die Isolation und Zugänglichkeit ist entscheidend, um die Galektine als Medikamente zukünftig einsetzen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolation durch die Affinitätschromatographie versucht (vergleiche 4.5). In bisher bestehenden Studien, die sich ebenfalls mit Galektinen befassten, konnte eine Isolation von Galektinen durch diese Methode beobachtet werden (151). Im Unterscheid hierzu, wurden die Galektine in vorherigen Studien in E-coli Bakterien mittels Expressionsvektor (pETM-11) exprimiert um die humanen Galektin-1 und Galektine-3 anschließend durch Chromatographie und Dialyse zu isolieren (122, 124, 151). Wir nutzen hierfür zur Transfektion menschliche embryonale Nierenzellen (HEK), wobei es sich um eukaryote Zelllinien handelt. Es ist zu beachten, dass die Glykolsierung von Proteinen durch Bakterien durch das fehlende endoplasmatische Retikulum verschiedenste andere Pfade nutzt, wie zum Beispiel eine schrittweise zytoplasmatische Phosphorylierung oder eine Lipid-carrier Form (154, 155). Dies könnte wiederum auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung der gelösten Substanzen im gesammelten konditionierten Medium haben und somit auch die Wirkung der Galektine auf die Zellen beeinflussen.

Wir verwendeten zur Isolation zunächst Chromatographiesäulen mit einer Alpha-Lactose Agarose. Eine Western Blot Analyse zeigte allerdings, dass die Agarose Beads weder Galektin-1 noch Galektin-3 binden konnten. Die Galektine gelangten bereits beim ersten Laden auf die Säule durch die Matrix hindurch in den Durchfluss (vergleiche 4.5.1). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Galektin-1 und -3, so wie es in der Literatur vorbeschrieben ist, nicht oder nur zu einem geringen Teil an α -Lactose binden(156). Da Galektine aber β -galactosyl bindende Proteine sind, ist die Affinität zu beta-Lactose höher als zur alpha-Lactose (156). Da beta-Lactose Agarose konventionell zunächst nicht lieferbar war, stellten wir Epoxy-activated β -Lactose Agarose selber her (vergleiche 3.6.5.) dieser Ansatz konnte allerdings nicht zur gewünschten Isolation führen. Der Versuch wurde mit wieder erhältlicher konventioneller Aminophenyl β -Lactose

Agarose wiederholt, was aber ebenso keinen Isolationserfolg erzielte. Um die Bindungsaffinität zwischen den beta-Lactose Agarose Beads und den Galektinen zu erhöhen, wurde eine Inkubationsverlängerung und eine Inkubation über Nacht durchgeführt, was den Versuchsausgang allerdings nicht ändern konnte (vergleiche 4.5.3). Um herauszufinden, ob die Ursache an den rekombinanten Galektinen oder an der verwendeten Agarose liegt, wurde der Versuch mit bereits isoliertem konventionellen Galektin durchgeführt.

Die hier systematische Durchführung verschiedener Versuchsdurchführungen ließ dennoch nicht auf die Fehlerquelle der Protein Affinitätschromatographie schließen. Die Affinitätschromatographie ist ein komplexes Verfahren, was die Berücksichtigung von verschiedensten Faktoren wie Bindungszeit, Protein und Liganden Affinität, pH und Temperaturstabilität erfordert (157). Der wohl entscheidende Schritt der Chromatographie, der uns nicht gelang, ist eine Bindung zwischen den an die Agarose gebundenen Liganden und den Galektinen im konditionierten Medium.

Galektine sind Karbohydrat bindende Proteine, mit einer β -galactosiden Bindungsstelle, durch die sie in der Lage sind, einen spezifischen Liganden zu erkennen und eine Bindung einzugehen (66). Die Bindung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Kräfte und van der Waal Bindungen gewährleistet (57). Jede Galektinklasse unterscheidet sich allerdings an ihrer „Carbohydrat recognition domain“ (CRD) und bindet Zuckermoleküle mit einer unterschiedlichen Bindungspräferenz. So gehört Galektin-1 zur Gruppe der prototypischen Galektine und besitzt nur eine CRD, währenddessen das chimerische Galektin-3 zunächst monomerisch vorliegt und durch seine Bindung am N-Terminal Multimere und sogar Pentamere bilden kann (57, 61). Es unterscheiden sich die Untereinheiten nahe der CRD und sorgen somit für eine Bindungsvariabilität in der Affinität der Galektinklassen (63). So hat Galektin-3 eine höhere Affinität zu wiederholenden Zuckermolekülen und Poly-N-acetyllactosamine. Währenddessen die Galektin-1 Bindung stark abhängig ist von einer terminalen beta-Galactose (57). Der Vorgang der Affinitätschromatographie beruht auf der Grundlage, dass die β -Lactose Agarose Beads während des Inkubationsvorgangs eine Bindung mit den Galektinen im konditionierten Medium eingehen können. Da sowohl Galektin-1 wie auch Galektin-3 eine hohe Affinität zu beta-galactosiden Strukturen und

somit auch zu beta- Lactose hat, konnte durch vielzählige Studien zur Affinitätsanalyse der Galektine belegt werden (57, 65, 158).

Die Komplexität der Bindungsmöglichkeiten der Galektine unterstreicht die Schwierigkeit der Auswahl der passenden Agarose Beads, die eine ausreichende Bindungsaffinität haben, um eine Immobilisation der Galektine auf der Chromatographiesäule gewährleisten zu können.

Als starkes Indiz für die fehlerhafte Bindung der Agarose spricht, dass auch das konventionelle Galekin nicht gebunden werden konnte (vergleiche 3.6.6) Neben einer zu niedrigen Affinität sollte auch eine zu hohe Affinität zwischen Ligand und Zielprotein ausgeschlossen werden (159). Eine zu hohe Affinität könnte zu sterischen Hindernissen führen, die Anzahl an unspezifischen Bindungen erhöhen oder eine Elution der Galektine von der Chromatographie Matrix verhindern. Letzteres konnten wir ausschließen, in dem wir nach jedem Schritt der Chromatographie Proben für eine Western Blot Analyse entnommen haben. So war es in der anschließenden Auswertung möglich, den genauen experimentellen Schritt zu bestimmen, zu dem die Galektine im Versuchsablauf verloren gegangen sind. Die Analyse zeigte, dass die Galektine bereits nach dem Laden der β -Lactose Agarose Beads auf die Chromatographiesäule zum größten Teil im Durchlauf nachgewiesen werden konnten (vergleiche 4.5) und somit die Bindung der Galektine an die β -Lactose und nicht die Elution die entscheidende Fehlerquelle gewesen sein könnte.

Galektine sind in der Lage, eine Vielzahl von Verbindungen mit unterschiedlichsten Strukturen einzugehen. So können sie nicht nur Karbohydrat Strukturen binden, sondern sind auch in der Lage an Strukturen im Zellkern und im Zytosol zu binden und somit in die Signalverarbeitung verschiedenster inter- und intra-zelluläre Prozesse einzugreifen (66). Somit haben die Galektine nicht einen spezifischen Rezeptor an den sie binden können, sondern binden je nach Galektinklasse abhängig von passenden Oligosaccharidstrukturen, an eine Reihe von Intra- und extrazellulären Strukturen (160). Die Glykosylierung der Galektine ist allerdings nicht nur abhängig von den O- und N-Glykan Strukturen der Liganden, sondern kann durch äußere Umstände wie Entzündungen und Zellstress verändert und beeinflusst werden (161). Ebenso zeigte die Präsenz von Sialinsäure eine Beeinflussung der Galektinbindungsmöglichkeiten (158). Eine mögliche Fehlerquelle für die fehlende Bindung von Galaktin-1 und -3

könnten somit auch andere potenzielle Bindungspartner sein, die von den 293-HEK Zellen ebenfalls in das Medium sezerniert werden und hierdurch die Bindung an die β -Lactose Agarose Beads stark reduzieren bzw. verhindern. Um auszuschließen, dass die Galektine nach oder während der Synthese der transfizierten Zellen sich bereits mit Inhalten des Mediums verbunden haben und nicht mehr frei vorliegen, kontrollierten wir die Inhaltsstoffe des verwendeten Zellkulturmedium DMEM/ Ham's F12 (Bio&Sell, Feucht, Deutschland) und konnten keinen Nachweis für Lactose oder Galactose, noch andere potenzielle Bindungspartner für Galektine finden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Galektine bereits bei ihrer Synthese durch die transfizierten Zellen an andere Proteine gekoppelt sein könnten.

Ebenso muss eine unspezifische Bindung anderer Moleküle durch die Lactose-Agarose ausgeschlossen werden (162). Da die Affinität der Galektine für β -galactoside Strukturen allerdings sehr hoch ist, kann dies weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Bindung zwischen dem aktivierten Liganden und der Zielstruktur während der Chromatographie ist pH und Temperaturabhängig (163). So führt die Erhöhung der Temperatur bis zu einem gewissen Punkt, zur Erhöhung der Bindungsaffinität. Wird ein Temperaturmaximum allerdings überschritten, kommt es zu einer Proteininstabilität und Proteindegeneration. PH und Temperaturschwankungen können demnach zu Konformationsänderungen führen und somit die Bindung während der Inkubation vermindern oder sogar verhindern (164, 165). Wir verwendeten zunächst eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C (vergleiche 3.5.5). Da hierdurch keine Bindung erreicht werden konnte, wurde die Inkubation variiert, indem Sie zunächst auf 30 min und 2 Stunden bei Raumtemperatur abgeändert wurde und nachdem dies ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg führte, bei 4°C über Nacht durchgeführt wurde (vergleiche 3.6.6) Trotz unterschiedlicher Inkubationszeiten und Temperaturen, zeigte sich keine Veränderung im Ergebnis der Isolation.

Um die Chromatographiesäule als Fehlerquelle ausschließen zu können, wurde die Säule durch eine Chromatographie mit Hilfe von Zentrifugation ersetzt (vergleiche 4.5.4). Auch dies konnte nicht zu einer Isolation der Galektine aus dem gesammelten konditionierten Medium führen.

Zusammenfassend kann der Fehler in der von uns durchgeführten Affinitätschromatographie im Rahmen der vorhandenen labortechnischen Möglichkeiten nicht gefunden werden.

5.4 Konzentrierung der Galektine im konditionierten Medium

5.4.1 Konzentrierung durch Zentrifugalkonzentratoren

Da die vollständige Isolation der Galektine durch Affinitätschromatographie nicht gelingen konnte, war der nächste alternative Schritt die Konzentration der Galektine im konditionierten Medium so weit wie möglich zu erhöhen. Dies war durch Zentrifugalkonzentratoren möglich, die eine größenspezifische Membran enthalten. Somit können sowohl kleinere als auch größere Proteine aus dem Medium entfernt werden. Das Verfahren ist sehr leicht zu kontrollieren und die Volumenänderung ist bereits optisch durch eine seitliche Skalierung sichtbar. Die verwendeten Konzentratoren sind sehr stabil und zeichnen sich durch eine hohe chemische Verträglichkeit aus. Es wird vom Hersteller eine bis zu 30fache Proteinkonzentrierung angegeben, was einer Proteinisolation sehr nahekommt. Das Verfahren ist einfach und einstufig, es benötigt keine spezielle Probenvorbereitung. Somit werden die möglichen Fehlerquellen stark reduziert.

Zunächst sollten kleinere Proteine aus dem konditionierten Medium entfernt werden, hierfür wurde für Galektin-1 ein Konzentrator mit einer Membran mit einem MWCO von 12 kDa und für Galektin-3 von 30 kDa gewählt. Dies führte zum gewünschten Erfolg einer Proteinaufkonzentrierung der Galektine, was sich durch eine Western-Blot Analyse bildlich darstellen ließ (vergleiche 4.6.1, 4.6.2).

Im nächsten Schritt sollten auch alle größeren Proteine entfernt werden, hierfür wurde ein Zentrifugalkonzentrator mit einer Membran mit einem Cut-off Wert von 30 kDa für Galekin-1 und 50 kDa für Galektin-3 gewählt. Das Ergebnis der Western-Blot Analyse zeigte, dass weder Galektin-1 noch Galektin-3 in der Lage war die Membran des Konzentrators zu durchdringen und sich das Galektin oberhalb der Membran ansammelte. Das Ergebnis der Western Blot Analyse war für Galekin-1 und Galektin-3 identisch.

Das konditionierte Medium enthält noch eine Vielzahl anderer Aminosäuren, Vitamine und anorganischer Salze, sowie auch Glucose, Phenol, Hypoxanthin

und Natriumpyruvat, um nur die größten Bestandteile zu nennen (Inhaltsstoffe wurden uns auf Nachfrage vom Hersteller Bio&Sell zur Verfügung gestellt). Einer der Inhaltsstoffe könnte ursächlich sein, für das Verstopfen der Poren der Membran, was wiederum das Durchdringen der Galektine verhindert haben könnte. Um größere Zellbestandteile und Überreste der Zellkultur, die ebenfalls ein Verstopfen verursacht haben könnten, vor dem Versuch auszuschließen, wurde das gesammelte konditionierte Medium vor seiner Lagerung und erneut kurz vor Versuchsbeginn zentrifugiert und das Pellet entfernt.

Nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Galektine nicht frei im konditionierten Medium vorliegen, sondern an andere Proteine oder Strukturen gekoppelt sind. Die gebundenen Galektine hätten somit eine größere Größe angenommen, als sie in ihrer ungebundenen Reinform haben. Hierdurch wären sie zu groß, um die Membran passieren zu können, da die Poren Proteine nur größenabhängig hindurch lassen. Um dies besser ausschließen zu können, wurde die Proteine der Probe des konditionierten Mediums vor Versuchsdurchführung mit SDS und DTT sowie Erhitzung denaturiert. Das Ergebnis konnte allerdings nicht verbessert werden, Galektin-1 und Galektin-3 blieben wie auch zuvor oberhalb der Membran und konnten nicht weiter konzentriert werden.

Die Proteinisolation mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren war somit nur teilweise erfolgreich, es ließ sich eine Proteinkonzentration durch den Ausschluss der kleineren, nicht aber größerer Proteine erreichen. Eine Fehlerquelle konnte trotz Fehleranalyse nicht gefunden werden.

5.4.2 Konzentrierung durch Proteindialyse

Die Proteindialyse wird angewandt, um Proteine mit Hilfe einer semipermeablen Dialysemembran größenabhängig voneinander zu trennen. Hierfür wurden zwei verschiedene Dialyseschläuche gewählt, die sich in ihrer Porengröße voneinander unterschieden. Die Dialyse als mögliche Aufreinigungs Technik wurde verwendet, da sich weder die Affinitätschromatographie noch die Zentrifugalkonzentratoren als geeignetes Verfahren für die Isolation der rekombinanten Galektine aus dem konditionierten Medium herausgestellt hatte.

Die verwendeten Dialyseschläuche besaßen je einen MWCO von 12-14 kDa und 50 kDa. Zunächst wurde der Schlauch mit dem kleineren MWCO gewählt, um

niedermolekulare Proteine aus dem konditionierten Medium zu entfernen. Hierbei zeigte sich für Galektin-1 eine sichtbare Bandenverdickung in der Western Blot Analyse, was auf eine erhöhte Galektin Konzentration durch den Ausschluss kleinerer Proteine spricht. Für Galektin-3 lässt sich dieser Effekt im Western Blot Bild nicht deutlich erkennen (vergleiche 4.6).

Das Ergebnis zeigte, dass die Proteindialyse ebenso wie die Zentrifugalkonzentratoren ein geeignetes Verfahren ist, um Proteine nach ihrer Größe zu trennen und niedermolekulare Stoffe zu entfernen. Für eine weitestgehend vollständige Proteinisolation ist es allerdings nötig, auch höhermolekulare Proteine zu entfernen. Das Ergebnis nach der Proteindialyse mit dem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 50 kDa zeigte aber, dass weder Galektin-1 noch Galektin-3 in der Lage waren, aus dem Schlauch mit den höhermolekularen Stoffen durch die Poren der Dialysemembran hinauszutreten. Hiermit haben wir dasselbe Problem wie bereits bei dem Isolationsversuch mit den Zentrifugalkonzentratoren. Obwohl Galektin-3 eine Größe von 35 kDa und Galektin-1 von 14 kDa besitzt, verhalten sich die rekombinanten Proteine wie höhermolekulare Stoffe.

Die Proteindialyse mit semipermeablen Membranen zur Isolation und Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe ist ein weit verbreitetes und getestetes Verfahren (142, 166). Es wird hauptsächlich verwendet, um gewünschte Zielproteine von niedermolekularen Stoffen zu trennen. Es wird als besonders wichtig beschrieben, dass das Puffervolumen ein Vielfaches des Volumens des Testmediums beträgt und die Dialysezeit adäquat ist (166). Somit wählten wir ein 50faches Volumen für die Puffersubstanz und eine Dialysezeit über Nacht, bzw. 24 Stunden. Außerdem ist eine korrekte Vorbereitung der Dialyseschläuche vor der Versuchsdurchführung wichtig. Die Dialysemembran mit einem MWVO von 14 kDa muss vorher ausreichend hydriert werden, währenddessen die zweite Membran mit einem MWVO von 50 kDa bereits vorbehandelt und für die Lagerung in Natriumazid eingelegt ist. Es ist wichtig, insbesondere den zweiten Schlauch korrekt in der Vorbereitung zu waschen, um ihn von potenziell störenden Lagerchemikalien zu befreien. Die Temperatur während der Dialyse hat zwar vergleichsweise wenig Einfluss, eine niedrige Temperatur von 4°C wird aber in der Literatur durch eine höhere Makromolekülstabilität ausgezeichnet (142). Deshalb wählten wir für unsere

Dialyse den Kühlraum mit einer Temperatur von 4°C als geeigneten Versuchsort aus.

Es ist somit davon auszugehen, dass die Grundvoraussetzungen für die Dialyse nach Vergleich mit dem Forschungsstand vergleichbarer Proteinisolation, gegeben war. Ein wichtiger Nachteil der Dialyse stellt den langen Versuchszeitraum da, weshalb die Dialyse zur Proteinisolation heutzutage oft durch neuere Verfahren wie die Chromatographie abgelöst wurde.

Es ist die Möglichkeit zu beachten, dass es auch hier den Galektine durch die Bindung an andere Liganden und Proteine nicht möglich ist, frei durch den Dialyseschlauch in den Puffer zu diffundieren. Eine mögliche zukünftige Lösung könnte hierbei die Vorbehandlung des konditionierten Mediums mit beta-Lactose sein, um die Bindungsstellen für andere β -Galactoside zu blockieren.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss rekombinanter Galektine auf retinale Pigmentepithelzellen getestet und deren Isolation aus konditioniertem Medium versucht, um die Proteine potenziell als Prophylaxe oder Therapie in der Behandlung der proliferativen Vitreoretinopathie einsetzen zu können. Es konnte gezeigt werden, eine Bioaktivität der durch Transfektion hergestellten rekombinanten Galektine-1 und -3 vorhanden war. An die erfolgreiche Isolation müsste in zukünftigen Laborarbeiten mit alternativen Techniken angeknüpft werden. Sollte dies gelingen, haben die Galektine ein hohes Potential, therapeutisch einsetzbar zu sein. Die negative Regulierung der Adhäsion und Migration und (potentiell, hier aber in unserer Arbeit nicht beweisbar) Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung der Proteine könnte das Anhängen eines HIS- oder SUMOS-Tags, das durch die spätere Hinzugabe von Proteasen wieder enzymatisch abgespalten werden kann (167)

Gegenwärtig beschränkt sich die Therapie der PVR auf das sorgfältige Abpräparieren der Membranen und das Tamponieren des Glaskörperaums mit Gas oder einer schweren Flüssigkeit. Eine pharmakologische Option zur Prophylaxe ist derzeit klinisch noch nicht erhältlich (11, 24). Um die Galektine als Medikamente einsetzen zu können, gilt es eine Vielzahl von Faktoren zu berücksichtigen. Diese wären unter anderem die Verfügbarkeit des Medikaments

an der benötigten Stelle, die gewünschten biochemischen Effekte, bei ausreichend hoher Konzentration und Biokompatibilität, und ein Ausschluss von Toxizität. Gleichzeitig müssen auch pharmakodynamische und pharmakokinetische Aspekte berücksichtigt werden.

Dabei soll das Medikament möglichst langfristig und in hoher Konzentration unabhängig von der Patienten Compliance freigesetzt werden. Hier liegt es nahe, einen Medikamententräger zu benutzen. In unserer Arbeit konnten wir die Proteine durch Transfektion bereits erfolgreich herstellen und ihre Bioaktivität gezeigt werden. Es gilt nun, einen geeigneten Weg der Isolation zu finden und anschließend die genaue Wirkung sowie Dosierung zu ermitteln.

Abschließend sollte am Transport der Galektine zu ihrem gewünschten Wirkungsort anhand der Testung eines geeigneten Medikamententräger geforscht werden. Hierzu ist die Testung von Hydrogelen, Polymerpartikel und Nanopartikel angedacht.

6. Zusammenfassung

Einleitung

Die proliferative Vitreoretinopathie stellt die häufigste Komplikation einer vitreoretinalen Operation dar und gilt als Anzeichen einer überschießenden Wundreaktion. Klinisch ist Sie durch die Entstehung von fibrotischen Membranen auf bzw. unter der Netzhaut gekennzeichnet, die in der Lage sind, sich zusammenzuziehen und durch Traktion die Netzhaut erneut abzulösen. Myofibroblastische und fibrotische Zellen bauen diese Membranen nach epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) von retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) und Müllerzellen im Glaskörper auf. Die Migration von retinalen Pigmentepithelzellen, Gliazellen und Immunzellen wie Makrophagen wurde beschrieben. Bislang beschränkt sich die Therapie auf das abpräparieren der Membranen. Eine medikamentöse Prophylaxe oder Therapie bestehen bislang nicht.

Galektine sind β -galactosid bindende Proteine, die durch ihre negativ adhäsive und migrative Wirkung auf die retinalen Pigmentepithelzellen einen potenziellen Therapiesansatz der PVR darstellen könnten.

Methoden

Um die Galektine zu synthetisieren, verwendeten wir die Technik der Transfektion von Überexpressionsplasmiden mit anschließender Selektion von Zellkulturen. Der Proteinnachweis fand anschließend mit Hilfe der Western Blot Technik und einer Fluoreszenzfärbung statt. Die rekombinant exprimierten Galektine wurden in konditioniertem Zellkulturmedium gesammelt und anschließend ihre Bioaktivität mittels einer Adhäsionsanalyse und einer BrdU-ELISA Zellproliferationsanalyse an retinalen RPE und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Des Weiteren wurde der Versuch unternommen, die rekombinanten Proteine durch Affinitätschromatographie, durch Konzentrierung der Proteine mit Zentrifugalkonzentratoren und Proteindialyse zu isolieren.

Ergebnisse

Nach erfolgreicher Transfektion konnte sowohl Galektin-1 wie auch Galektin-3 im konditionierten Medium nachgewiesen werden. Die Testung der Bioaktivität der Proteine zeigte einen hemmenden Einfluss auf die Adhäsion von retinalen Pigmentepithelzellen. Der Einfluss auf die Proliferation war in der verwendeten Dosierung für die Anwendung an RPE Zellen nicht signifikant. Es konnte eine gesteigerte Proliferation durch den Einfluss von Galektin-1 und -3 auf HUVEC Zellen beobachtet werden, dieser war allerdings nur für Galektin-1 signifikant. Die Isolation von Galektin-1 und -3 aus dem konditionierten Medium mit verschiedenen Agarose Beads mit anschließender Affinitätschromatographie durch Konzentrierung der Proteine mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren und Proteindialyse zur Konzentrierung oder Isolation führte nicht zum gewünschten Erfolg.

Diskussion

In der vorgelegten Doktorarbeit konnte eine erfolgreiche Transformation und Expression von rekombinantem Galektin-1 und -3 gezeigt werden. Da die Isolation der Proteine durch Affinitätschromatographie, Konzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren und Dialyse nicht erfolgreich war, sollten andere Wege z.B. mittels spezifischer Tags beschriftet werden.

Die Ergebnisse geben insgesamt einen Ansatzpunkt für weitere Forschungen zur Isolation sowie Testung der Proteine auf ihre Wirkung und möglichen Einsatz als Therapeutikum zur Prävention der PVR.

7. Summary

Introduction

Proliferative vitreoretinopathy is the most common complication of vitreoretinal surgery and is considered a sign of an excessive wound reaction. Clinically, it is characterised by the formation of fibrotic membranes on or under the retina, which are able to contract and re-detach the retina through traction. Myofibroblastic and fibrotic cells build up these membranes after epithelial to mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelial cells (RPE) and Müller cells in the vitreous body. The migration of retinal pigment epithelial cells, glial cells and immune cells such as macrophages has been described. To date, treatment has been limited to membrane peeling. Drug prophylaxis or therapy have not yet been developed.

Galectins are β -galactoside binding proteins that could represent a potential therapeutic approach for PVR due to their negative adhesive and migratory effect on the retinal pigment epithelial cells.

Methods

To synthesize the galectins, we used the technique of transfection of overexpression plasmids with subsequent selection of cell cultures. Protein detection was then carried out using the Western blot technique and fluorescence staining. The recombinantly expressed galectins were collected in conditioned cell culture medium and their bioactivity was analysed using adhesion analysis and BrdU-ELISA cell proliferation analysis on retinal RPE and human microvascular endothelial cells (HUVEC). Furthermore, an attempt was made to isolate the recombinant proteins by affinity chromatography, by concentrating the proteins with centrifugal concentrators and protein dialysis.

Results

After successful transfection, both galectin-1 and galectin-3 could be detected in the conditioned medium. Testing of the bioactivity of the proteins showed an inhibitory effect on the adhesion of retinal pigment epithelial cells. The influence on proliferation was not significant in the dosage used for application to RPE cells. Increased proliferation was observed due to the influence of galectin-1 and -3 on HUVEC cells, but only significant for galectin-1. The isolation of galectin-1 and -

3 from the conditioned medium using different agarose beads with subsequent affinity chromatography by concentration of the proteins with the aid of centrifugal concentrators and protein dialysis for concentration or isolation did not lead to the desired success.

Discussion

In the doctoral thesis presented, successful transformation and expression of recombinant galectin-1 and -3 was demonstrated. Since the isolation of the proteins by affinity chromatography, concentration using centrifugal concentrators and dialysis was not successful, other methods, e.g. using specific tags, should be used.

Overall, the results provide a starting point for further research into the isolation and testing of the proteins for their effect and possible use as a therapeutic agent for the prevention of PVR.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AK.....	<i>Antikörper</i>
ANOVA.....	<i>einfaktorische Varianzanalyse</i>
APCs.....	<i>Alkylphosphocholine</i>
CRD.....	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
DAPI.....	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM Ham's F12.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Ham's F12</i>
DTT.....	<i>Dithiothreitol</i>
ECM.....	<i>extrazelluläre Matrix</i>
EMT.....	<i>Epithelial-mesenchymal Transition</i>
GAL1.....	<i>Galektin-1</i>
GAL-3.....	<i>Galektin 3</i>
Huvec.....	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
kDA.....	<i>Kilodalton</i>
LMU.....	<i>Ludwigs Maximilians Universität</i>
M.....	<i>Mol</i>
MWCO.....	<i>molecular weight cut off</i>
PBS.....	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR.....	<i>Polymerase Kettenreaktion</i>
PDGFR.....	<i>Platelet-derived growth factor</i>
Pen/Strep.....	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
PVDF.....	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
PVR.....	<i>Proliferative Vitreoretinopathie</i>
RPE.....	<i>Retinales Pigmentepithel, retinale Pigmentepithel</i>
SDS.....	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
upm.....	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
VEGF.....	<i>vascular endothelial growth factor</i>

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien.....	32
Tabelle 2: Zellkulturgeräte	33
Tabelle 3: Zellkulturmaterialien.....	34
Tabelle 4: Materialien Plasmid Transfektion.....	36
Tabelle 5: Wester Blot Labormaterialien.....	40
Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungen für die SDS-PAGE.....	41
Tabelle 7: Lösungen und Waschpuffer	42
Tabelle 8: Antikörper Western Blot	45
Tabelle 9: Coomassie Blau Färbung	46
Tabelle 10: Materialien Zellfärbung	47
Tabelle 11: Antikörper Zellfärbung.....	48
Tabelle 12: Puffer Affinitätschromatographie.....	54
Tabelle 13: Chromatographie Materialien.....	54
Tabelle 14: Puffer zur Synthese nicht konventioneller Epoxy-activated Sepahrose gekoppelt mit β - Lactose.....	56
Tabelle 15: Materialien zur Synthese nicht konventioneller beta Lactose Agarose.....	56
Tabelle 16: Zentrifugalkonzentratoren.....	60
Tabelle 17: Dialyse Materialien.....	63
Tabelle 18: Übersicht der Quantifizierung der Adhäsionsanalyse von ARPE- 19 Zellen mit und ohne Galektin-1 Inkubation im Beobachtungszeitraum von 0 - 180 min (Mittelwert \pm Standardabweichung)	77
Tabelle 19: Post-hoc Test (Games-Howell) für die Adhäsion der APE-19 Zellen, die in 50 % und in 100 % konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-1 inkubiert wurden, tabellarische Darstellung der Signifikanz für den Unterschied zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen	77
Tabelle 20: Übersicht der Quantifizierung der Adhäsionsanalyse von ARPE- 19 Zellen mit und ohne Galektin-3 Inkubation im Beobachtungszeitraum von 0- 180 min.	79
Tabelle 21: Post-hoc Test (Games-Howell) für die Adhäsion der APE-19 Zellen, die in 50 % und in 100 % konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-3 inkubiert wurden, tabellarische Darstellung der Signifikanz für den Unterschied zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen	80

8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des RPE, veröffentlicht im Journal of Tissue Engineering (8). Das RPE ist mit seiner basalen Seite zur Bruch's Membran und der apikalen Kommunikation zu den Photorezeptoren dargestellt. 11
- Abbildung 2: Pathogenese Schritte der PVR, veröffentlicht im Journal "International Ophthalmology Clinics" (23)..... 13
- Abbildung 3: Galektin Subklassen und ihre Bindungsformation, veröffentlicht im Expert Reviews in Molecular Medicine (63) 20
- Abbildung 4: Die verschiedenen Galektin Subklassen, ihre Bindungsmöglichkeiten und ihre biologischen Aufgaben. Veröffentlicht im "nature reviews microbiology" (64)..... 23
- Abbildung 5: Neubauer Zählkammer, Raster Veröffentlicht auf Zaehlkammer.de(130)..... 36
- Abbildung 5: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pCMV3-LGALS3, dass LGALS3 unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert. Zusätzlich enthält der Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin und Hygromycin zur Selektion von transformierten E.coli und eukaryonten Zellen, veröffentlicht auf der Website des Herstellers Sinobiological (131)..... 37
- Abbildung 6: Der Molekularmechanismus des Lipofectamin 3000, veröffentlicht in Expert Reviews in Molecular Medicine 2003 Cambridge University (132)..... 38
- Abbildung 8: Schritte der Affinitätschromatographie, veröffentlicht auf sinobiological.com (141) 59
- Abbildung 10: Western Blot Analyse für die Expression von Galektin-1 in konditioniertem Medium. 1-4: Konditioniertes Medium von Zellen nach Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid für Galektin-1..... 67
- Abbildung 11: Western Blot Analyse für die Expression von Galektin-1 in konditioniertem Medium. 1-4: Konditioniertes Medium von Zellen nach Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid für Galektin-3..... 67
- Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung für Galektin-1 und -3 der transformierten HEK-293 EBNA Zelllinien. Immunfluoreszenzfärbung von HEK-293 EBNA Zellen nach Transfektion zur Überexpression mit dem Überexpressionsvektor für Galektin-1 (A) und Galektin-3 (C) sowie unbehandelten Kontrollzellen gegen Galektin-1 (A, B; grün) und Galektin-3 (C, D; grün). Die Zellkerne sind blau dargestellt; Messbalken: 20µm..... 68
- Abbildung 13: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 konditioniertem Medium direkt nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (D) direkt nach dem Aussäen fotodokumentiert..... 69

Abbildung 14: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 konditioniertem Medium 90 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium Galektin-1 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektin (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (D) direkt nach dem Aussäen fotodokumentiert 70

Abbildung 15: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-1 konditioniertem Medium 180 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditioniertem Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-1 (D) 180 Minuten nach dem Aussäen fotodokumentiert..... 71

Abbildung 16: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-3 in konditioniertem Medium direkt nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditionierten Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (D) direkt nach dem Aussäen fotodokumentiert..... 73

Abbildung 17: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-3 konditioniertem Medium 90 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditionierten Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (D) 90 Minuten nach dem Aussäen fotodokumentiert..... 74

Abbildung 18: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit Galektin-3 konditioniertem Medium 180 Minuten nach dem Aussäen. Nach dem Trypsinieren wurden ARPE-19 Zellen mit 1:1 verdünntem konditionierten Medium ohne Galektine (A), 50 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (B), 100 % konditioniertem Medium ohne Galektine (C) und 100 % konditioniertem Medium mit Galektin-3 (D) 180 Minuten nach dem Aussäen fotodokumentiert..... 75

Abbildung 18: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galekin-1 in 50 % und 100 % Konzentration * 50% Gal1 versus 50% Kontrolle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; #100% Gal1 versus 100% Kontrolle, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ Trypsinierte ARPE-19 Zellen wurden ausplattiert und in konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantem Galektin-1 in einer 1:1 Verdünnung oder unverdünnt inkubiert und über 3 Stunden beobachtet und dokumentiert. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der adhärennten Zellen zu jedem Zeitpunkt ermittelt und die Werte graphisch dargestellt. 78

Abbildung 19: Adhäsion von ARPE-19 Zellen nach Inkubation mit und ohne rekombinantem Galekin-3 konditioniertem Medium in 50-prozentiger und 100-prozentiger Konzentration. * 50% Gal3 versus 50% Kontrolle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; #100% Gal3 versus 100% Kontrolle,

- #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 Trypsinierte ARPE-19 Zellen wurden ausplattiert und in konditioniertem Medium mit und ohne rekombinantes Galektin-3 in einer 1:1 Verdünnung oder unverdünnt inkubiert und über 3 Stunden beobachtet und dokumentiert. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der adhärennten Zellen zu jedem Zeitpunkt ermittelt und die Werte graphisch dargestellt. 81
- Abbildung 20: Proliferation der ARPE-19 Zellen mit konditioniertem Medium ohne (Kontrolle) oder mit rekombinatem Galektin-1, bzw. Galektin-3 als Säulendiagramm Zur Testung der Proliferation von ARPE-19 Zellen wurde eine ELISA Proliferationsanalyse durchgeführt und die Proliferation anschließend quantifiziert und die mit rekombinatem Galektin behandelten Zellen mit einer Kontrolle verglichen. 82
- Abbildung 21: Proliferation der HUVEC Zellen nach Inkubation in konditioniertem Medium ohne Galektin (Kontrolle) oder mit rekombinatem Galektin-1, bzw. Galektin-3 als Säulendiagramm. Zur Testung der Proliferation von HUVEC Zellen wurde ein BrdU ELISA durchgeführt und die mit rekombinatem Galektin behandelten Zellen mit einer Kontrolle verglichen (Mittelwert \pm SD; n = 5 von 5 unabhängigen Experimenten). 83
- Abbildung 22: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression nach Chromatographie 84
- Abbildung 23: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression nach Chromatographie 85
- Abbildung 24: Western Blot für Galektin-1 nach Affinitätschromatographie mit selbst synthetisierter und konventioneller Aminophenyl beta-lactose Agarose..... 86
- Abbildung 25: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression nach Chromatographie mit Verlängerung der Inkubation auf 2 Stunden über Nacht..... 87
- Abbildung 26: Western Blot Analyse nach Affinitätschromatographie mit bereits konzentriertem Galektin-1 88
- Abbildung 27: Western Blot Analyse Galektin-3 nach Proteinisolation mit Zentrifugation 89
- Abbildung 28: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Vivaspin 2 Centrifugator Concentrator (MWCO: 12 kDa)..... 90
- Abbildung 29: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Pierce Protein Konzentrator, MWCO 30 kDa 91
- Abbildung 30: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Pierce Protein Konzentrator (MWCO: 30 kDa)..... 92
- Abbildung 31: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit Hilfe des Pierce Protein Konzentrator (MWCO: 50 kDa)..... 93

-
- Abbildung 32: Western Blot Analyse auf Galektin-1 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit zweifacher Dialyse und Zentrifugation mit dem Proteinkonzentrator 95
- Abbildung 33: Western Blot Analyse auf Galektin-3 Expression vor und nach Konzentrierung des konditionierten Mediums mit zweifacher Dialyse und Zentrifugation mit dem Proteinkonzentrator 96

Danksagung

Ich möchte mich hier bei allen Personen bedanken, die es mir mit ihrer Unterstützung ermöglich haben, die letzten Jahre an dieser Doktorarbeit zu arbeiten.

Zuallererst gilt mein Dank meinem Doktorvater, Professor Dr. Andreas Ohlmann, der mir es überhaupt ermöglich hat, an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Seine wissenschaftliche Anleitung, Anregungen und Ratschläge haben mich viel von seinen Erfahrungen lernen lassen. Ich danke ihm für seine Zeit und die hervorragende und umsichtige Betreuung während der gesamten Arbeit. Durch seine Expertise konnten auch schwierige Herausforderungen gemeistert werden.

Ich möchte außerdem Herrn Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger danken, durch ihn wurde eine Promotion an der Augenklinik der LMU München möglich.

Ich danke meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Claudia Priglinger, die durch ihre Forschung an den Galektinen und wissenschaftlichen Anreize den Grundstein dieser Arbeit gesetzt hat und uns durch hilfreiche Tipps unterstützt und angeleitet hat.

Ich danke PD. Dr.Christian Wetheimer, der mich insbesondere in der Anfangsphase durch seine Recherchen und Ideen sehr unterstützt hat. Ohne seine Expertise wäre mein Laboranfang deutlich erschwert gewesen.

Ich danke Katja für ihre laborexperimentelle Expertise und ihre Geduld, mich mit dem Arbeiten im Labor vertraut zu machen und insbesondere für ihre Unterstützungen bei den zahlreichen Western Blots.

Ich danke dem gesamten Laborteam und meinen Mit-Doktoranden. Insbesondere für den Austausch, das gute Zureden und die hilfreichen Kaffeepausen, sowie „Labormeeetigs“.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Hans-Georg und Claudia Havertz, die mich stets mit liebevollem Zureden unterstützt haben und durch die ich nie Kraft und Mut verloren haben. Ohne ihre seelische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich meinem Freund, Jan Stüven danken. Für seine positive, motivierende und liebevolle Art. Besonders für seine Geduld und Verständnis, meine Sorgen und Ängste zu ertragen und mir den nötigen Rückhalt zu geben.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Havertz, Caroline

Name, Vorname

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

Isolation und Testung von rekombinanten Galektinen zur Prophylaxe der proliferativen Vitreoretinopathie

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, 10.11.2024

Ort, Datum

Caroline Havertz

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Literaturverzeichnis

1. Gabriele E. Lang GKL. Augenheilkunde. Stuttgart Thieme 2019.
2. Sachsenweger M. Duale Reihe Augenheilkunde 2ed. Stuttgart: Thieme 2003.
3. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO. Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2014;42:44-84.
4. Grehn F. Augenheilkunde 32 ed. Berlin ; Heidelberg,: Springer 2019.
5. Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 2001;4(9):877-86.
6. Bonilha VL. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Exp Eye Res.* 2014;126:38-45.
7. Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):296-323.
8. Fronk AH, Vargis E. Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. *J Tissue Eng.* 2016;7:2041731416650838.
9. Strauss O. [Retinal pigment epithelium]. *Ophthalmologe.* 2009;106(4):297-8.
10. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845-81.
11. Priglinger CS, Priglinger S. [Pharmacological approach to treatment of proliferative vitreoretinopathy]. *Ophthalmologe.* 2013;110(10):948-59.
12. Chtcheglova LA, Ohlmann A, Boytsov D, Hinterdorfer P, Priglinger SG, Priglinger CS. Nanoscopic Approach to Study the Early Stages of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) of Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells In Vitro. *Life (Basel).* 2020;10(8).
13. Wiedemann P, Bringmann A. [Proliferative Vitreoretinopathy]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2016;233(9):1012-5.
14. Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: revised concepts of pathogenesis and adjunctive treatment. *Eye (Lond).* 2020;34(2):241-5.
15. Priglinger SG, Siedlecki J, Hattenbach LO, Grisanti S. [Proliferative vitreoretinopathy (PVR) surgery: Scar Wars : Five steps to successful treatment of PVR detachment]. *Ophthalmologe.* 2021;118(1):18-23.
16. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, Di Lauro S, Gonzalez-Buendia L, Delgado-Tirado S. Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Prog Retin Eye Res.* 2016;51:125-55.
17. Mudhar HS. A brief review of the histopathology of proliferative vitreoretinopathy (PVR). *Eye (Lond).* 2020;34(2):246-50.
18. Chen Z, Shao Y, Li X. The roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR. *Mol Vis.* 2015;21:706-10.
19. Zou H, Shan C, Ma L, Liu J, Yang N, Zhao J. Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy. *PeerJ.* 2020;8:e10136.
20. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90.
21. Stern J, Temple S. Retinal pigment epithelial cell proliferation. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(8):1079-86.
22. Kampik A, Kenyon KR, Michels RG, Green WR, de la Cruz ZC. Epiretinal and vitreous membranes. Comparative study of 56 cases. *Arch Ophthalmol.* 1981;99(8):1445-54.
23. Idrees S, Sridhar J, Kuriyan AE. Proliferative Vitreoretinopathy: A Review. *Int Ophthalmol Clin.* 2019;59(1):221-40.
24. Schaub F, Enders P, Fauser S. [Proliferative Vitreoretinopathy: Therapeutic Strategies]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2016;233(9):1016-23.
25. Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21(1):127-44.
26. Khan MA, Brady CJ, Kaiser RS. Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update. *Retina.* 2015;35(2):165-75.
27. Priglinger DmS. Plombenchirurgie klinikum.uni-muenchen.de LMU Augenklinik München [Available from: <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Augenklinik-und-Poliklinik/de/Schwerpunkte/Netzhaut/Ablatio/plombenchirurgie/index.html#top>].
28. Adelman RA, Parnes AJ, Sipperley JO, Ducournau D. Strategy for the management of complex retinal detachments: the European vitreo-retinal society retinal detachment study report 2. *Ophthalmology.* 2013;120(9):1809-13.
29. Quiram PA, Gonzales CR, Hu W, Gupta A, Yoshizumi MO, Kreiger AE, et al. Outcomes of vitrectomy with inferior retinectomy in patients with recurrent rhegmatogenous retinal detachments and proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology.* 2006;113(11):2041-7.

30. Tsui I, Schubert HD. Retinotomy and silicone oil for detachments complicated by anterior inferior proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(9):1228-33.
31. Mietz H, Kirchhof B, Heimann K. Anterior proliferative vitreoretinopathy in trauma and complicated retinal detachment. A histopathologic study. *Ger J Ophthalmol*. 1994;3(1):15-8.
32. Hoerster R, Hermann MM, Rosentreter A, Muether PS, Kirchhof B, Fauser S. Profibrotic cytokines in aqueous humour correlate with aqueous flare in patients with rhegmatogenous retinal detachment. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(4):450-3.
33. Kon CH, Occleston NL, Aylward GW, Khaw PT. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(3):705-12.
34. Turgut B, Uyar F, Ustundag B, Celiker U, Akpolat N, Demir T. The impact of tacrolimus on growth factors in experimental proliferative vitreoretinopathy. *Retina*. 2012;32(2):232-41.
35. Savur F, Aydemir O, İlhan N. The effect of infliximab and octreotide on cytokine levels experimental proliferative vitreoretinopathy. *Cutan Ocul Toxicol*. 2020;39(1):61-6.
36. Behrens-Baumann W, Vogel M. Experimental study on drug therapy of "traction retinal detachment" after posterior penetrating eye injury in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1986;224(6):513-9.
37. Sherif M, Wolfensberger TJ. Intraocular Dexamethasone Implant as Adjunct to Silicone Oil Tamponade for Proliferative Vitreoretinopathy. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2017;234(4):501-4.
38. Banerjee PJ, Quartilho A, Bunce C, Xing W, Zvobgo TM, Harris N, et al. Slow-Release Dexamethasone in Proliferative Vitreoretinopathy: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial. *Ophthalmology*. 2017;124(6):757-67.
39. Chen W, Chen H, Hou P, Fok A, Hu Y, Lam DS. Midterm results of low-dose intravitreal triamcinolone as adjunctive treatment for proliferative vitreoretinopathy. *Retina*. 2011;31(6):1137-42.
40. Pennock S, Rheume MA, Mukai S, Kazlauskas A. A novel strategy to develop therapeutic approaches to prevent proliferative vitreoretinopathy. *Am J Pathol*. 2011;179(6):2931-40.
41. Ghasemi Falavarjani K, Hashemi M, Modarres M, Hadavand Khani A. Intrasilicone oil injection of bevacizumab at the end of retinal reattachment surgery for severe proliferative vitreoretinopathy. *Eye (Lond)*. 2014;28(5):576-80.
42. Falavarjani KG, Hadavandkhani A, Parvaresh MM, Modarres M, Naseripour M, Alemzadeh SA. Intra-silicone Oil Injection of Methotrexate in Retinal Reattachment Surgery for Proliferative Vitreoretinopathy. *Ocul Immunol Inflamm*. 2020;28(3):513-6.
43. Sundaram V, Barsam A, Virgili G. Intravitreal low molecular weight heparin and 5-Fluorouracil for the prevention of proliferative vitreoretinopathy following retinal reattachment surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013(1):Cd006421.
44. Schaub F, Hoerster R, Schiller P, Felsch M, Kraus D, Zarrouk M, et al. 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*. 2018;19(1):384.
45. London NJS, Kaiser RS, Khan MA, Alshareef RA, Khuthaila M, Shahlaee A, et al. Determining the effect of low-dose isotretinoin on proliferative vitreoretinopathy: the DELIVER trial. *Br J Ophthalmol*. 2019;103(9):1306-13.
46. Eibl KH, Lewis GP, Betts K, Linberg KA, Gandorfer A, Kampik A, et al. The effect of alkylphosphocholines on intraretinal proliferation initiated by experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(3):1305-11.
47. Ishikawa K, He S, Terasaki H, Nazari H, Zhang H, Spee C, et al. Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy. *Sci Rep*. 2015;5:16386.
48. Ishikawa K. [Periostin in the Pathogenesis of Proliferative Vitreoretinopathy]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2015;119(11):772-80.
49. Pennock S, Haddock LJ, Elliott D, Mukai S, Kazlauskas A. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? *Prog Retin Eye Res*. 2014;40:16-34.
50. Pennock S, Kim D, Mukai S, Kuhnle M, Chun DW, Matsubara J, et al. Ranibizumab is a potential prophylaxis for proliferative vitreoretinopathy, a nonangiogenic blinding disease. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1659-70.
51. Moysidis SN, Thanos A, Vavvas DG. Mechanisms of inflammation in proliferative vitreoretinopathy: from bench to bedside. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:815937.
52. Oshima Y, Sakamoto T, Hisatomi T, Tsutsumi C, Ueno H, Ishibashi T. Gene transfer of soluble TGF-beta type II receptor inhibits experimental proliferative vitreoretinopathy. *Gene Ther*. 2002;9(18):1214-20.

53. Saika S, Yamanaka O, Ikeda K, Kim-Mitsuyama S, Flanders KC, Yoo J, et al. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrotic reaction of retinal pigment epithelial cells. *Lab Invest.* 2005;85(7):838-50.
54. Lyu Y, Xu W, Zhang J, Li M, Xiang Q, Li Y, et al. Protein Kinase A Inhibitor H89 Attenuates Experimental Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(2):1.
55. Chan YC, Lin HY, Tu Z, Kuo YH, Hsu SD, Lin CH. Dissecting the Structure-Activity Relationship of Galectin-Ligand Interactions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
56. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473(1):172-85.
57. Cummings RD, Liu FT, Vasta GR. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.; 2015. p. 469-80.
58. Vasta GR. Galectins in Host-Pathogen Interactions: Structural, Functional and Evolutionary Aspects. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1204:169-96.
59. Nielsen MI, Stegmayr J, Grant OC, Yang Z, Nilsson UJ, Boos I, et al. Galectin binding to cells and glycoproteins with genetically modified glycosylation reveals galectin-glycan specificities in a natural context. *J Biol Chem.* 2018;293(52):20249-62.
60. Modenutti CP, Capurro JIB, Di Lella S, Martí MA. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Front Chem.* 2019;7:823.
61. Caridi B, Doncheva D, Sivaprasad S, Turowski P. Galectins in the Pathogenesis of Common Retinal Disease. *Front Pharmacol.* 2021;12:687495.
62. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9186940.
63. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e17.
64. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(6):424-38.
65. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):232-54.
66. Johannes L, Jacob R, Leffler H. Galectins at a glance. *J Cell Sci.* 2018;131(9).
67. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994;269(33):20807-10.
68. Fred Brewer C. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):255-62.
69. García Caballero G, Kaltner H, Kutzner TJ, Ludwig AK, Manning JC, Schmidt S, et al. How galectins have become multifunctional proteins. *Histol Histopathol.* 2020;35(6):509-39.
70. Blanda V, Bracale UM, Di Taranto MD, Fortunato G. Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
71. Gao Z, Liu Z, Wang R, Zheng Y, Li H, Yang L. Galectin-3 Is a Potential Mediator for Atherosclerosis. *J Immunol Res.* 2020;2020:5284728.
72. Slack RJ, Mills R, Mackinnon AC. The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021;130:105881.
73. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1855(2):235-47.
74. Hara A, Niwa M, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Matsuo M, et al. Galectin-3 as a Next-Generation Biomarker for Detecting Early Stage of Various Diseases. *Biomolecules.* 2020;10(3).
75. Chou FC, Chen HY, Kuo CC, Sytwu HK. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
76. Mirandola L, Yu Y, Chui K, Jenkins MR, Cobos E, John CM, et al. Galectin-3C inhibits tumor growth and increases the anticancer activity of bortezomib in a murine model of human multiple myeloma. *PLoS One.* 2011;6(7):e21811.
77. Mirandola L, Yu Y, Cannon MJ, Jenkins MR, Rahman RL, Nguyen DD, et al. Galectin-3 inhibition suppresses drug resistance, motility, invasion and angiogenic potential in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2014;135(3):573-9.
78. Amano M, Suzuki M, Andoh S, Monzen H, Terai K, Williams B, et al. Antiangiogenesis therapy using a novel angiogenesis inhibitor, anginex, following radiation causes tumor growth delay. *Int J Clin Oncol.* 2007;12(1):42-7.

79. Ito K, Stannard K, Gabutero E, Clark AM, Neo SY, Onturk S, et al. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3-4):763-78.
80. Garcia-Revilla J, Deierborg T, Venero JL, Boza-Serrano A. Hyperinflammation and Fibrosis in Severe COVID-19 Patients: Galectin-3, a Target Molecule to Consider. *Front Immunol.* 2020;11:2069.
81. Delaine T, Collins P, MacKinnon A, Sharma G, Stegmayr J, Rajput VK, et al. Galectin-3-Binding Glycomimetics that Strongly Reduce Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Modulate Intracellular Glycan Recognition. *Chembiochem.* 2016;17(18):1759-70.
82. Patterson RJ, Haudek KC, Voss PG, Wang JL. Examination of the role of galectins in pre-mRNA splicing. *Methods Mol Biol.* 2015;1207:431-49.
83. Van den Brûle FA, Fernandez PL, Buicu C, Liu FT, Jackers P, Lambotte R, et al. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. *Dev Dyn.* 1997;209(4):399-405.
84. Li FY, Wang SF, Bernardes ES, Liu FT. Galectins in Host Defense Against Microbial Infections. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1204:141-67.
85. Vasta GR. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol.* 2012;946:21-36.
86. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006;16(11):137r-57r.
87. Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J Immunol.* 2017;199(11):3721-30.
88. Vas V, Fajka-Boja R, Ion G, Dudics V, Monostori E, Uher F. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells.* 2005;23(2):279-87.
89. Bianco GA, Toscano MA, Ilarregui JM, Rabinovich GA. Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation. *Autoimmun Rev.* 2006;5(5):349-56.
90. Baum LG, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol.* 2003;109(3):295-307.
91. Castillo-González R, Cibrian D, Fernández-Gallego N, Ramírez-Huesca M, Saiz ML, Navarro MN, et al. Galectin-1 expression in CD8(+) T lymphocytes controls inflammation in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2020.
92. Goud NS, Soukya PSL, Ghouse M, Komal D, Alvala R, Alvala M. Human Galectin-1 and Its Inhibitors: Privileged Target for Cancer and HIV. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(16):1369-78.
93. Cousin JM, Cloninger MJ. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
94. Martínez-Bosch N, Navarro P. Galectins in the Tumor Microenvironment: Focus on Galectin-1. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1259:17-38.
95. Kopitz J, von Reitzenstein C, André S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, et al. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35917-23.
96. Wu D, Kanda A, Liu Y, Kase S, Noda K, Ishida S. Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition. *Faseb j.* 2019;33(2):2498-513.
97. Abu El-Asrar AM, Ahmad A, Allegaert E, Siddiquei MM, Alam K, Gikandi PW, et al. Galectin-1 studies in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2020;98(1):e1-e12.
98. Andrade FEC, Covre JL, Ramos L, Hazarbassanov RM, Santos MSD, Campos M, et al. Evaluation of galectin-1 and galectin-3 as prospective biomarkers in keratoconus. *Br J Ophthalmol.* 2018;102(5):700-7.
99. Mello-Bosnic C, Gimenes AD, Oliani SM, Gil CD. Treatment with galectin-1 eye drops regulates mast cell degranulation and attenuates the severity of conjunctivitis. *Eur J Pharmacol.* 2018;833:124-30.
100. Mello CB, Ramos L, Gimenes AD, Andrade TR, Oliani SM, Gil CD. Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(2):693-704.
101. Rajasagi NK, Suryawanshi A, Sehrawat S, Reddy PB, Mulik S, Hirashima M, et al. Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunopathological lesions. *J Immunol.* 2012;188(9):4631-43.
102. Luis J, Eastlake K, Khaw PT, Limb GA. Galectins and their involvement in ocular disease and development. *Exp Eye Res.* 2020;197:108120.
103. Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
104. Chen SC, Kuo PL. The Role of Galectin-3 in the Kidneys. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):565.

105. Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1374-83.
106. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2004;9(2):305-28.
107. Elliott MJ, Strasser A, Metcalf D. Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *J Immunol.* 1991;147(9):2957-63.
108. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol.* 2006;176(2):778-89.
109. Argüeso P, Mauris J, Uchino Y. Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer. *Tissue Barriers.* 2015;3(3):e1026505.
110. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2018;41(2):599-614.
111. Wang C, Zhou X, Ma L, Zhuang Y, Wei Y, Zhang L, et al. Galectin-3 may serve as a marker for poor prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Pathol Res Pract.* 2019;215(10):152612.
112. Kim SJ, Chun KH. Non-classical role of Galectin-3 in cancer progression: translocation to nucleus by carbohydrate-recognition independent manner. *BMB Rep.* 2020;53(4):173-80.
113. Zhang L, Wang P, Qin Y, Cong Q, Shao C, Du Z, et al. RN1, a novel galectin-3 inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo via blocking galectin-3 associated signaling pathways. *Oncogene.* 2017;36(9):1297-308.
114. Zhong X, Qian X, Chen G, Song X. The role of galectin-3 in heart failure and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019;46(3):197-203.
115. Málek F. [Impact of galectin 3 as myofibrosis marker in clinical cardiology]. *Vnitr Lek.* 2014;60(4):327-30.
116. Srejovic I, Selakovic D, Jovicic N, Jakovljević V, Lukic ML, Rosic G. Galectin-3: Roles in Neurodevelopment, Neuroinflammation, and Behavior. *Biomolecules.* 2020;10(5).
117. Nishikawa H, Liu L, Nakano F, Kawakita F, Kanamaru H, Nakatsuka Y, et al. Modified Citrus Pectin Prevents Blood-Brain Barrier Disruption in Mouse Subarachnoid Hemorrhage by Inhibiting Galectin-3. *Stroke.* 2018;49(11):2743-51.
118. Díaz-Alvarez L, Ortega E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9247574.
119. Mauris J, Mantelli F, Woodward AM, Cao Z, Bertozzi CR, Panjwani N, et al. Modulation of ocular surface glycocalyx barrier function by a galectin-3 N-terminal deletion mutant and membrane-anchored synthetic glycopolymers. *PLoS One.* 2013;8(8):e72304.
120. Argüeso P, Guzman-Aranguez A, Mantelli F, Cao Z, Ricciuto J, Panjwani N. Association of cell surface mucins with galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *J Biol Chem.* 2009;284(34):23037-45.
121. Fujii A, Shearer TR, Azuma M. Galectin-3 enhances extracellular matrix associations and wound healing in monkey corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 2015;137:71-8.
122. Obermann J, Priglinger CS, Merl-Pham J, Geerlof A, Priglinger S, Gotz M, et al. Proteome-wide Identification of Glycosylation-dependent Interactors of Galectin-1 and Galectin-3 on Mesenchymal Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16(8):1528-46.
123. Alge CS, Priglinger SG, Kook D, Schmid H, Haritoglou C, Welge-Lussen U, et al. Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):415-26.
124. Priglinger CS, Szober CM, Priglinger SG, Merl J, Euler KN, Kernt M, et al. Galectin-3 induces clustering of CD147 and integrin-beta1 transmembrane glycoprotein receptors on the RPE cell surface. *PLoS One.* 2013;8(7):e70011.
125. Alge-Priglinger CS, Andre S, Kreutzer TC, Deeg CA, Kampik A, Kernt M, et al. Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by the human lectin galectin-1. *Mol Vis.* 2009;15:2162-73.
126. Alge-Priglinger CS, Andre S, Schoeffl H, Kampik A, Strauss RW, Kernt M, et al. Negative regulation of RPE cell attachment by carbohydrate-dependent cell surface binding of galectin-3 and inhibition of the ERK-MAPK pathway. *Biochimie.* 2011;93(3):477-88.
127. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246(3):788-91.
128. Pastor JC, Fernández I, Coco RM, Sanabria MR, Rodríguez de la Rúa E, Piñon RM, et al. Variations in Functional and Anatomical Outcomes and in Proliferative Vitreoretinopathy

- Rate along a Prospective Collaborative Study on Primary Rhegmatogenous Retinal Detachments: The Retina 1 Project-Report 4. ISRN Ophthalmol. 2012;2012:206385.
129. Department of Ophthalmology L-M-U, Munich, Germany. Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by the human lectin galectin-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898636>
. 32.10.2009.
130. GmbH L-L. Zählkammer Neubauer - Improved zaehlkammer.de: LO - Laboroptik GmbH; [Available from: <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>].
131. Sinobiological. Galectin-1 cDNA ORF Clone, Human, untagged. sinobiological.com
132. Theory L. Complexation of DNA and transfection reagent
theory.labster.com Labster Theory 2018 [updated 18.04.2018. Available from: <https://theory.labster.com/complexation-dna-transfection-reagent/>].
133. Merck KGaA D. Introduction to SDS-PAGE – Separation of Proteins Based on Size sigmaaldrich.com Merck 2020 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sds-page.html>].
134. Rad B. Western Blot Transfer Buffer bio-rad.com Bio-Rad; 2020 [Available from: <https://www.bio-rad.com/featured/en/western-blot-transfer-buffer.html>].
135. ThermoFisher. Using a mounting medium can improve your image www.thermofisher.com: [Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/labeling-your-samples/mounting-media.html>].
136. Roche. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) sigma-aldrich.com sigma-aldrich.com 2018
137. Rad B. Introduction to Affinity Chromatography bio-rad.com Bio Rad; 2020
138. Hemschemeier DSK, Maelicke PDA. Die Trennung von Proteinen durch Affinitätschromatographie chemgapedia.de: Chemgaroo; n.d.
[Available from: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/chromatographie.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/affin1.vscml.html].
139. Merck KGaA D. Agarose sigmaaldrich.com Merck 2020 [Available from: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/agarose.html?gclid=Cj0KCQiAhs79BRD0ARIsAC6XpaXdqkoFsmmGh9IfAGJZe5GNHFNmV52V6A7C8z0aMJdzTawQyvZOVNYaAqCWEALw_wcB].
140. Biotech C. Affinity chromatography: Which tag to use? Website: cube-biotech.com 2020 [Available from: https://cube-biotech.com/us/affinity-chromatography-which-tag-to-use?gclid=Cj0KCQiA-rj9BRCAARIsANB_4AA80-QVODUkFzKZUQDZ3WdNcAY2Jqe5C4zKeLtt6sba9_JJ_38X40aAsaEALw_wcB].
141. Biological S. Protein Purification by Affinity Chromatography sinobiological.com Sino Biological 2007 [Available from: <https://www.sinobiological.com/resource/protein-review/protein-purification-by-ac>].
142. Andrew SM, Titus JA, Zumstein L. Dialysis and concentration of protein solutions. Curr Protoc Cell Biol. 2001;Appendix 3:Appendix 3C.
143. Ltd MM. Visking Dialysis Membranes in London London Medicell Membranes Ltd [Available from: <https://www.medicellmembranes.co.uk/visking-dialysis-membrane.html>].
144. ATCC. ARPE-19, CRL-2302™. www.atc.org ATCC.
145. Zanon Cde F, Sonehara NM, Girol AP, Gil CD, Oliani SM. Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation. Mol Vis. 2015;21:1036-50.
146. Uehara F, Ohba N, Ozawa M. Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(10):2164-72.
147. Boscher C, Dennis JW, Nabi IR. Glycosylation, galectins and cellular signaling. Curr Opin Cell Biol. 2011;23(4):383-92.
148. Yang N, Zhang W, He T, Xing Y. Suppression of Retinal Neovascularization by Inhibition of Galectin-1 in a Murine Model of Oxygen-Induced Retinopathy. J Ophthalmol. 2017;2017:5053035.
149. Zhu X, Wang K, Zhang K, Xu F, Yin Y, Zhu L, et al. Galectin-1 knockdown in carcinoma-associated fibroblasts inhibits migration and invasion of human MDA-MB-231 breast cancer cells by modulating MMP-9 expression. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2016;48(5):462-7.

150. Dos Santos SN, Sheldon H, Pereira JX, Paluch C, Bridges EM, El-Cheikh MC, et al. Galectin-3 acts as an angiogenic switch to induce tumor angiogenesis via Jagged-1/Notch activation. *Oncotarget*. 2017;8(30):49484-501.
151. Priglinger CS, Obermann J, Szober CM, Merl-Pham J, Ohmayer U, Behler J, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition of RPE Cells In Vitro Confers Increased beta1,6-N-Glycosylation and Increased Susceptibility to Galectin-3 Binding. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146887.
152. Chen WS, Cao Z, Leffler H, Nilsson UJ, Panjwani N. Galectin-3 Inhibition by a Small-Molecule Inhibitor Reduces Both Pathological Corneal Neovascularization and Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(1):9-20.
153. Kalaivani V, Krishna MS, Kumar AA, Satheesh G, Jaleel A. O-glycan structures in apo(a) subunit of human lipoprotein(a) suppresses the pro-angiogenic activity of galectin-1 on human umbilical vein endothelial cells. *Faseb j*. 2023;37(3):e22813.
154. Li H, Debowski AW, Liao T, Tang H, Nilsson HO, Marshall BJ, et al. Understanding protein glycosylation pathways in bacteria. *Future Microbiol*. 2017;12:59-72.
155. Koomey M. O-linked protein glycosylation in bacteria: snapshots and current perspectives. *Curr Opin Struct Biol*. 2019;56:198-203.
156. Evaluation of galectin binding by frontal affinity chromatography (FAC). [Internet]. 2015 . Available from: <https://www.ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/pubmed/25253133>.
157. Magdeldin DS. Affinity Chromatography of Lectins, AffinityChromatography,. online InTech; 2012.
158. Brewer CF. Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. *Glycoconj J*. 2002;19(7-9):459-65.
159. Urh M, Simpson D, Zhao K. Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol*. 2009;463:417-38.
160. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:158-82.
161. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(6):346-66.
162. Magdeldin S. Affinity Chromatography: IntechOpen; 2012.
163. Cytiva GLS. Epoxy-activated Sepharose 6B Affinity media cytiva.com: Cytiva.com 2020 [Available from: <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=12824>.
164. Krepper W, Satzer P, Beyer BM, Jungbauer A. Temperature dependence of antibody adsorption in protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A*. 2018;1551:59-68.
165. Sagermann M, Chapleau RR, DeLorimier E, Lei M. Using affinity chromatography to engineer and characterize pH-dependent protein switches. *Protein Sci*. 2009;18(1):217-28.
166. Scopes RK. Protein Purification: Principles and Practice: Springer New York; 1993.
167. Chang TH, Hsieh FL, Zebisch M, Harlos K, Elegheert J, Jones EY. Structure and functional properties of Norrin mimic Wnt for signalling with Frizzled4, Lrp5/6, and proteoglycan. *Elife*. 2015;4.