

## **Immune modulatory effects of angiogenic factors in corneal transplantation – Ann-Charlott Schneider**

Köln 2018

**Zusammenfassung:** Eine gesunde Hornhaut ist essentiell für unser Sehen. Deswegen ist Sie frei von Blut- und Lymphgefäßen. Wenn allerdings Krankheiten oder Verletzungen die Hornhaut belasten trübt Sie ein, und oft wachsen auch Blut- und Lymphgefäße in die Hornhaut ein. Die einzige therapeutische Lösung ist häufig eine Hornhauttransplantation. Allerdings werden Hornhauttransplantate erheblich häufiger vom Immunsystem des Patienten oder der Patientin abgestoßen, wenn die Hornhaut von eingewachsenen Blut- und Lymphgefäßen betroffen ist.

Da diese Gefäße, im Labor, in die gesunde avaskuläre Hornhaut induziert werden können, sind Hornhauttransplantationen ein einzigartiges und gut geeignetes Modell zur Untersuchung der Rolle von angiogenen Faktoren bei Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem in Organ- oder Gewebetransplantationen. Die Rolle von angiogenen Faktoren, und deren Einfluss auf Immunzellen und die Umgebung der Hornhaut, während einer Abstoßungsreaktion zu untersuchen ist besonders wichtig, da der molekulare Mechanismus bisher weitestgehend unbekannt ist.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es zu untersuchen, ob die Blockade von angiogenen Faktoren eine aktive Veränderung im Immunsystem des Hornhauttransplantatempfängers verursacht. Es wird postuliert, dass diese aktive Veränderung zu einer Annahme des Transplantats führt.

Die Daten dieser Doktorarbeit, im Zusammenhang mit bereits publizierten Studien, zeigen das Blut- und Lymphgefäße in der Hornhaut eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Hornhauttransplantaten spielen. Außerdem wird in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl der Status der Hornhaut selbst, als auch die Aktivierung der Immunzellen wichtig sind. Die Immunzellen und die Umgebung der Hornhaut können durch lokale oder systemische Behandlung mit anti-angiogenen Faktoren beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass das Einwachsen von Lymphgefäßen in die Hornhaut durch lokale Gabe von ‚Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C/D trap‘ und ‚Semaphorin3F‘ verhindert werden kann. Es wird außerdem gezeigt, dass nur Semaphorin3F das Überleben des Transplantats verbessert. Im Gegensatz dazu hat das Blockieren des ‚Adhensionsmoleküles ‚Activated Lymphocyte Adhesion Molecule (ALCAM)‘ keinen Einfluss auf das Einwachsen von Gefäßen, verbessert aber die Annahme eines

Hornhauttransplantats. Dies zeigt die vielseitigen Effekte die angiogene Faktoren auf das Gefäßwachstum und die Reaktion des Immunsystems auf ein Transplantat haben können.

Vaskularisation der Hornhaut, im Mausmodell, wird gleichermaßen durch lokale und systemische Gabe von ‚VEGFR1/R2 trap‘ verhindert. Zusätzlich zur Verhinderung des Gefäßwachstums, wird in dieser Arbeit gezeigt, dass beide Behandlungen das Überleben von Hornhauttransplantaten verbessern indem Immunzellen und deren direkte Umgebungen (z.B. Zytokinelevel) verändert werden.

Der Effekt von VEGF auf das Immunsystem, konnte in dieser Arbeit zusätzlich in vitro gezeigt werden; die Blockade von VEGF in Zellkulturen von Dendritischen Zellen der Maus veränderte deren Phänotyp und die Funktion dieser Zellen.

Diese Doktorarbeit zeigt umfassend, dass die Akzeptanz von Hornhauttransplantaten ein komplexes Zusammenspiel von Gefäßen und Immunzellen ist. Die Blockade von VEGF hat das Potential die Akzeptanz von Hornhauttransplantaten zu verbessern, indem sowohl das Einwachsen von Gefäßen in die Hornhaut verhindert wird, als auch die Immunzellen und deren Umgebung direkt beeinflusst werden.

**Abstract:** Corneal transplantations provide a unique model to study the underlying problem of immune rejection of grafts in organ and tissue transplantation as the healthy cornea is avascular. This provides a unique opportunity to study the role of vascularization and vessel inducing factors and their effect on immune cells and environment in graft rejection as the underlying mechanisms are largely unknown.

This thesis investigated the hypothesis that depletion of anti-angiogenic compounds induces an active immune modulation of the recipient and thereby induce active graft acceptance not ignorance. Previously published studies and the data in this thesis clearly show that while the presence of blood and especially lymphatic vessels is an important contributing factor to corneal graft rejection, the status of the corneal environment and immune cells associated with the cornea are equally important. Furthermore, immune cells and their environment can be affected by topical or systemic treatment with anti-angiogenic compounds.

The data in this thesis demonstrated that corneal lymphangiogenesis can be prevented by topical application of ‚Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C/D trap‘ and Semaphorin3, but only Semaphorin3F improved subsequent graft survival. Blocking of ‚Activated Lymphocyte Adhesion Molecule‘ (ALCAM) did in turn not affect vessel ingrowth into the cornea but nonetheless improved graft survival. Neovascularization was equally prevented by systemic and topical VEGFR1/R2 trap. Both treatments improved subsequent corneal graft survival by modification of the immune environment and immune cells as well as impairment of vessel ingrowth. Lastly the murine model of skin transplantation following corneal transplantation showed that corneal graft acceptance did not lead to a systemic

tolerance of donor antigens as skin transplants were rejected. This thesis additionally shows that autologous VEGF depletion in murine dendritic cell cultures functionally and phenotypically altered these immune cells demonstrating the immune-modulatory effect of VEGF signaling.

Thus, this thesis concludes that corneal graft acceptance is a complex interplay of vessels and immune cells. Depletion of VEGF has the potential to improve graft survival both by inhibiting vessel ingrowth, and also by direct immune modulation of immune cells and the corneal microenvironment.