

Macrophage function in corneal hem- and lymphangiogenesis

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anne Kiese Wetter

aus Hilden

Köln

2019

Zusammenfassung

Die gesunde Hornhaut (Kornea) ist bis auf den angrenzenden Limbus blut- und lymphgefäßfrei. Dieser Zustand wird durch eine Vielzahl von anti-angiogenen Mechanismen aktiv aufrechterhalten. Bei zahlreichen Erkrankungen der Hornhaut kann jedoch die Expression pro-angiogener Faktoren nicht mehr durch anti-angiogene Mechanismen kompensiert werden, sodass Blut- und Lymphgefäße sekundär in die zentrale Hornhaut einwachsen. Diese pathologischen Gefäße sind mit einer Visusminderung, immunologischen Erkrankungen der Augenoberfläche und Abstoßungsreaktionen nach Hornhauttransplantationen assoziiert. Therapieoptionen, welche die Gefäßrückbildung beschleunigen, sind limitiert. Die Untersuchung der bisher wenig verstandenen zellularen und molekularen Mechanismen, die zu kornealer Gefäßbildung führen, ist daher von großer Wichtigkeit.

Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass Makrophagen durch die Sekretion pro-angiogener Faktoren zur kornealen Angiogenese beitragen. Ihre spezifische Rolle bei der Aussprossung, Aufrechterhaltung und Rückbildung kornealer Gefäße ist bisher jedoch nicht untersucht. Aus anderen Organsystemen ist bekannt, dass Makrophagen auf Grund ihrer funktionellen Heterogenität in unterschiedlichen Aktivierungszuständen vorliegen und durch pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften zur Wundheilung beitragen. Dabei sind die von Makrophagen exprimierten Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 als wichtige Faktoren für die inflammatorische Makrophagenrekrutierung beschrieben worden. In der Kornea sind die Mechanismen der Makrophagenrekrutierung und Aktivierung nach Verwundung jedoch bisher nicht hinreichend bekannt. Die Aufklärung dieser Mechanismen nach kornealer Verwundung, sowie die Untersuchung der phasenspezifischen Funktion von Makrophagen während der kornealen Angiogenese, war daher Ziel dieser Arbeit.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verwundungsmodelle an der murinen Hornhaut im Hinblick auf die vaskuläre und entzündliche Antwort untersucht: das Inzisions- und das Fadenmodell. Das Inzisionsmodell ist ein bisher wenig charakterisiertes, akutes Verwundungsmodell, bei dem eine zentrale Inzision in der Kornea platziert wird. Dies führt zum vorübergehenden Aussprossen von Lymphgefäßen in die Kornea, wobei keine Blutgefäßaussprossung induziert wird. Das Fadenmodell ist ein gut etabliertes, chronisches Verwundungsmodell bei dem drei Nylonfäden für 14 Tage intrastromal in die Hornhaut eingebracht werden. Dies induziert ein zeitgleiches Aussprossen von Blut- und Lymphgefäßen, welche bis zu 6 Monate über die Fadenentfernung hinaus persistieren.

In den durchgeführten Studien wurden zunächst beide Modelle im Zeitverlauf nach Verwundung im Hinblick auf die Dynamik der Makrophageninfiltration und Gefäßbildung charakterisiert. Zwischen akuter und chronischer Verwundung war eine unterschiedliche vaskuläre und inflammatorische Dynamik zu beobachten. Eine akute Verwundung induzierte eine vorübergehende Makrophageninfiltration, ähnlich zur vorübergehenden Aussprossung von Lymphgefäßen. Dahingegen induzierte die chronische Verwundung eine lange persistierende Makrophageninfiltration, ähnlich zur Ausbildung persistierender Blut- und Lymphgefäße.

Um die Abhängigkeit beider Prozesse und die phasenspezifische Rolle von Makrophagen während der kornealen Angiogenese zu untersuchen, wurden diese durch lokale Injektion von Clodronat-Liposomen in unterschiedlichen Phasen nach Verwundung depletiert. Dabei zeigte sich in beiden Modellen eine deutliche Abhängigkeit der kornealen Angiogenese von Makrophagen, besonders in der frühen Phase nach Verwundung. Durch die für das Fadenmodell charakteristischen persistierenden Gefäße, konnte der Einfluss von Makrophagen auf die Aufrechterhaltung kornealer Gefäße untersucht werden. Zwei Wochen nach Fadenentfernung konnten Lymphgefäße noch deutlich durch die Depletion von Makrophagen reduziert werden, während kein Effekt auf Blutgefäße mehr zu beobachten war. Dies impliziert, dass frühe korneale Wundmakrophagen zur Induktion der Hem- und Lymphangiogenese beitragen, während späte Wundmakrophagen zudem eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Lymphgefäßen spielen. Die weitergehende Charakterisierung beider Modelle zeigte eine unterschiedliche Expression pro- und anti-inflammatorischer Faktoren, die auf das Vorliegen unterschiedlich aktivierter Makrophagen in beiden Modellen hindeuten. Akute Verwundung resultierte in der spezifischen Aktivierung prolymphangiogener Makrophagen, während chronische Verwundung mit der Aktivierung prohäm- und prolymphangiogener Makrophagen einherging.

Um die Mechanismen der Rekrutierung von Makrophagen in die Hornhaut zu untersuchen, wurde weiterhin die Rolle der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 in beiden Modellen charakterisiert. Der *knockout* beider Chemokinrezeptoren führte jedoch weder zu einer Verringerung der Makrophagenzahlen in der Hornhaut noch zu einer Reduzierung der Angiogenese nach kornealer Verwundung. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die kornealen Mechanismen der Makrophagenrekrutierung grundlegend von denen in anderen Geweben unterscheiden. Die pharmakologische Blockierung der Chemokinrezeptoren CCR2 oder CX3CR1 stellt daher keine erfolgsversprechende Therapieoption in der Hornhaut dar.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die korneale Häm- und Lymphangiogenese von Makrophagen und deren spezifischen Aktivierungszuständen abhängig ist, welche durch die Art der Verwundung induziert werden. Therapieoptionen, die auf die Modulation oder Inhibition von Makrophagen abzielen, können allerdings nur die Aussprossung von Blutgefäßen unterdrücken, jedoch nicht die Regression bereits etablierter Blutgefäße beschleunigen. Im Gegensatz dazu, könnte durch Inhibition von Makrophagen die Rückbildung pathologischer Lymphgefäße beschleunigt werden. Dies ist klinisch von besonderer Relevanz, da hauptsächlich korneale Lymphgefäße im Zusammenhang mit immunologischen Erkrankungen der Augenoberfläche, sowie immunologischen Abstoßungsreaktionen von kornealen Transplantaten assoziiert sind.

Abstract

The healthy cornea is except for the adjacent limbus devoid of blood and lymphatic vessels. Its avascular state is actively maintained by several antiangiogenic mechanisms. However, in various types of corneal disease, upregulation of proangiogenic factor expression can no longer be compensated by the antiangiogenic mechanisms. Blood and lymphatic vessels may then sprout from the limbal vasculature and invade the central cornea. In addition to vision impairment, these neovessels have been associated with corneal surface diseases and are considered the number one risk factor for corneal transplant rejection. Therapeutic options promoting regression of these neovessels are limited. Investigating the cellular and molecular mechanisms of corneal angiogenesis, which are currently insufficiently understood, is therefore of great importance.

Previous studies have identified macrophages as important regulators of corneal angiogenesis e.g. by their secretion of proangiogenic growth factors. However, their specific role in vessel sprouting, maintenance, and regression in the cornea is unknown. From other organ systems it is known that macrophages may adopt different activation states due to their phenotypic plasticity and promote wound healing by their pro- and anti-inflammatory activities. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 that are expressed on macrophages have been shown to mediate inflammatory monocyte/macrophage recruitment in this process. However, in the cornea the mechanisms of macrophage recruitment and macrophage activation are poorly characterized. Unravelling these mechanisms and analyzing the phase-specific function of macrophages in corneal angiogenesis was therefore the aim of this study.

Two different mouse models of corneal injury were analyzed in this thesis with respect to their inflammatory and vascular dynamics: the incision injury model and the suture placement model. The incision injury model is a recently characterized, acute injury model that involves placement of a full-thickness perforating incision in the corneal center, which leads to the isolated outgrowth of lymphatic but not blood vessels. By contrast, the suture placement model is a well-established model of chronic corneal injury. Here, three nylon sutures are placed into the corneal stroma for 14 days, which leads to the parallel outgrowth of blood and lymphatic vessels into the central cornea. In this injury model blood- and lymphatic vessels are persistent and can still be detected after up to 6 months after suture removal. Both injury models displayed distinct inflammatory and vascular dynamics. Acute incision injury induced transient macrophage infiltration, corresponding to transient lymphatic vessel sprouting. Chronic suture placement injury induced persistent macrophage infiltration, similar to the induction of persistent blood and lymphatic vessels. Thus, in both injury models macrophage infiltration and angiogenesis correlated in time, indicating an interrelationship between both processes.

To analyze the functional interrelationship between macrophage infiltration and vascular growth, macrophages were depleted by local application of clodronate liposomes in different phases of the corneal response after incision and suture placement injury. These analyses demonstrated that corneal angiogenesis was dependent on the presence of macrophages, especially in early phase after injury. Furthermore, persistent neovessels in the suture placement model also allowed for the analysis of the role of macrophages in vessel maintenance. Two weeks after suture removal lymphatic vessels were still

significantly reduced by macrophage depletion, while no effect on blood vessels was observed. Further experiments performed to characterize both injury models revealed distinct expression of pro- and anti-inflammatory factors that point to different macrophage activation profiles in both injury models. Acute incision injury appeared to induce specific activation of a prolymphangiogenic macrophage phenotype, while chronic suture placement injury evoked both prohemangiogenic and prolymphangiogenic macrophages.

In order to unravel the mechanisms of macrophage recruitment in the cornea, the role of CCR2 and CX3CR1 was investigated in corresponding eGFP (enhanced green fluorescent protein) reporter and knockout mice. Although both receptors were significantly upregulated in the cornea after injury, CCR2 or CX3CR1 gene deletion did neither result in a decrease in macrophage numbers, nor in alterations of angiogenesis in the injured cornea. Thus, the mechanisms of corneal macrophage recruitment may substantially differ from those observed in other tissues. Pharmacological targeting of the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 in order to suppress corneal angiogenesis and inflammation may therefore not be a promising approach.

In summary, the results demonstrate that corneal hem- and lymphangiogenesis is dependent on macrophages and their specific activation, which is specifically induced by the nature of the corneal damage response. Macrophage-targeted therapy concepts may only prevent blood vessel outgrowth after corneal injury but may not accelerate regression of already established blood vessels. By contrast, macrophage-targeted therapy concepts may be helpful in facilitating lymphatic vessel regression and thus ameliorating ocular surface disease and promoting corneal transplant survival.