

DISS. ETH NO. 21081

**New insights into lymphatic function in steady-state
and inflammation**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

David Aebischer

Master of Science in Medical Biology
University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Born November 27, 1985

Citizen of

Tafers, Fribourg, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter

Prof. Dr. Michael Detmar

1.1 Summary

Lymphatic vessels (LVs) are involved in various pathological conditions, such as tumor spread and chronic inflammation, which are characterized by profound lymphatic remodeling and lymphangiogenesis. Particularly in the context of chronic inflammation the functional significance of inflammation-induced lymphangiogenesis is not well understood. The aim of this thesis was to investigate how inflammation-induced changes in the lymphatic network affect immune function in draining lymph nodes (dLNs). Additionally, we aimed at describing the biologic effects of two newly discovered mediators of lymphangiogenesis.

In a first project, we investigated the effect of inflammation on LV function and on the induction of adaptive immune responses in dLNs, working in a mouse model of acute and chronic skin inflammation. These experiments revealed that albeit lymphatic drainage was reduced in the context of skin inflammation, the migration of dendritic cells (DCs) to dLNs was not compromised or even enhanced in presence of inflammation. Interestingly, we observed that acute or chronic skin inflammation significantly enhanced the induction of adaptive immune responses in dLNs. In line with these findings, DCs isolated from LN draining inflamed skin were more potent in inducing T cell proliferation and cytokine production in in vitro co-culture experiments, possibly due to increased expression of the co-stimulatory molecules CD40 and of the p40 subunit of the T-cell activating cytokines interleukin (IL)-12 and IL-23. Furthermore, we observed signs of auto-immunity in mice with chronic skin inflammation.

In the second project, we identified a novel role of the cytokine IL-7 in LV biology. We observed that lymphatic endothelial cells (LECs) not only produce IL-7 but also express the IL-7 receptor chains and responded to recombinant IL-7 in vitro and in vivo. Using several genetic mouse models, we were able to demonstrate a role for

IL-7 in shaping lymphatic vessel morphology and lymphatic draining function. Moreover, performing near-infrared in vivo imaging in mice deficient in the IL-7 receptor gene, we could show that the defect in drainage function was due to impaired fluid uptake into lymphatic capillaries. Furthermore, experiments performed in bone marrow chimeras or in RAG1^{-/-} mice treated with recombinant IL-7 demonstrated that the supportive role of IL-7 on lymphatic drainage occurred independently of the presence of IL-7 receptor-expressing lymphocytes or other hematopoietic cells. Overall, our data point towards an unexpected new role for IL-7 as an autocrine mediator of lymphatic drainage.

In the third study, the role of the glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α 1 (GDNFR α -1) in LEC biology was investigated. GDNFR α -1 is a receptor for the glial cell line-derived factor (GDNF), which plays a prominent role in the neuronal system. In this study, we demonstrated expression of GDNFR α -1 and its co-receptor RET in cultured LECs. Furthermore, GDNFR α -1 expression was detected on LVs in human skin. Functional in vitro assays revealed that GDNF mediates distinct cellular processes in LECs, such as cell migration, adhesion and chemotaxis. Furthermore, GDNF-induced LEC migration was effectively abrogated by treatment with an inhibitor or RET, demonstrating that GDNF signals via the GDNFR α -1/RET pathway in LECs. Overall, these findings revealed a previously unknown role for GDNFR α -1 and its ligands in LEC biology.

Collectively, the results of this thesis provide novel insights into LEC and LV biology in both steady-state and inflammation. They highlight the important role of LVs in the induction of adaptive immune responses and further characterize the function of two newly identified lymphangiogenic factors, namely, IL-7 and GDNF. The knowledge gained from this work might provide valuable insights for the design of new therapeutic approaches to prevent or treat pathologies associated with the lymphatic vascular system.

1.2 Résumé

Les vaisseaux lymphatiques (VLs) ont un rôle prépondérant dans de nombreuses pathologies comme les tumeurs et les maladies inflammatoires. Durant ces pathologies, les VLs se multiplient par un processus appelé la lymphangiogenèse et subissent de profondes modifications. Malgré ces observations, le rôle exact de la lymphangiogenèse observée durant les maladies inflammatoires reste obscure.

Les buts de cette thèse sont, premièrement de comprendre l'impact des modifications des VLs sur l'initiation des réponses immunitaires adaptatives dans les nœuds lymphatiques drainant (NLd) un tissu enflammé. Deuxièmement, d'étudier les effets de deux nouveaux médiateurs de la lymphangiogenèse sur les VLs.

Le premier projet étudie, à l'aide d'un modèle murin d'inflammation chronique de la peau, les effets de l'inflammation sur les fonctions lymphatiques ainsi que sur l'initiation des réponses immunitaires acquises dans les NLd. Ces expériences ont permis de démontrer que la capacité de drainage des VLs est réduite durant l'inflammation. En dépit de cette observation, nous avons pu montrer que la capacité des cellules dendritiques (CDs) de migrer au travers des VLs est quant à elle inchangée voire augmentée durant l'inflammation. Un phénomène très intéressant a pu être observé, la présence d'inflammation de la peau, qu'elle soit aiguë ou chronique, amplifie l'initiation des réponses immunitaires acquises. En accord avec ces observations, des expériences durant lesquelles des CDs isolées de NLd sont mises en co-culture avec des cellules T, ont permis de montrer que les CDs isolées de NLd situés en aval d'un tissu enflammé sont de meilleures initiateuses de la prolifération des cellules T et augmentent leurs capacités à produire des cytokines effectrices. De plus, nous avons identifié l'implication de deux molécules dans ce processus, CD40 ainsi que la sous-unité p40 des cytokines interleukin (IL)-12 et IL-

23. Finalement, nous avons aussi constaté que les souris souffrant d'inflammations chroniques présentent des signes d'auto-immunité.

Le deuxième projet a permis d'identifier un rôle inconnu à ce jour de la cytokine IL-7 dans la biologie des VLs. Premièrement, nous avons observé que les cellules endothéliales lymphatiques (CELs) expriment cette cytokine ainsi que ses récepteurs, et que le traitement de ces cellules avec une source externe de IL-7 provoque leur activation in vitro et in vivo. A l'aide de différentes souris génétiquement modifiées, nous avons pu dévoiler que l'IL-7 a un rôle dans l'organisation des VLs ainsi que dans leurs fonctions de drainage. En outre, nous avons démontré que l'absence de l'IL-7 réduit les capacités d'absorption des fluides par les VLs, en utilisant des souris déficientes en IL-7 et une méthode d'imagerie basée sur les rayons infrarouges proches. Enfin, à l'aide d'expériences effectuées sur des souris chimères de la moelle osseuse ainsi que sur des souris RAG1^{-/-} traitées avec de l'IL-7 recombinante nous avons pu démontrer que le rôle de l'IL-7 dans le contrôle de la capacité de drainage des VLs est indépendant de la présence de lymphocytes ainsi que d'autres cellules hématopoïétiques.

Le troisième et dernier projet, explore le rôle du récepteur $\alpha 1$ pour le facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNFR $\alpha 1$) dans la biologie des CELs. Ce récepteur ainsi que son ligand, GDNF, sont connus pour leur rôle prédominant dans le système nerveux. Nous rapportons dans cette étude que ce récepteur ainsi que sont co-récepteur, RET, sont exprimés à la surface des CELs. Par ailleurs, nous avons pu montrer à l'aide de tests fonctionnels in vitro que GDNF module différents processus cellulaires tel la migration, l'adhésion et la chimiotaxie. En outre, nous avons pu prouver que l'effet de GDNF est bel et bien contrôlé par la voie cellulaire initiée par GDNFR $\alpha 1$ /RET car il peut être aboli par le traitement des cellules avec un inhibiteur de RET.

Globalement, les résultats présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre la biologie des CELs et des VLs durant l'état d'équilibre ainsi qu'en conditions inflammatoires. Ils mettent en évidence le rôle prépondérant qu'occupent les VLs dans l'induction de la réponse immunitaire acquise ainsi que les effets de deux facteurs lymphangiogéniques récemment découverts, l'IL-7 et GDNF. En somme, les connaissances acquises au travers de ce travail pourraient représenter une aide précieuse dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir et soigner différentes pathologies associées au système lymphatique.