

DISS. ETH NO. 22664

**NEW TOOLS FOR THE STUDY OF  
ANGIOGENIC AND LYMPHANGIOGENIC  
PROCESSES DEMONSTRATE IMPORTANT  
ROLES OF ENDOGENOUS MEDIATORS**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
ALEXANDRA MICHAELA OCHSENBEIN  
MSc. Human Biology  
University of Zurich, Switzerland

Born on 20.06.1984  
Citizen of Fahrni, Bern, Switzerland

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Michael Detmar, examiner  
Prof. Dr. Cornelia Halin Winter, co-examiner

2015

## SUMMARY

In vertebrates, blood and lymphatic vessels are critically involved in many physiological processes such as the transport of fluids, gases, macromolecules, and cells. Importantly, they are also involved in pathological conditions including cancer and chronic inflammation, and are thought to represent promising therapeutic targets. Indeed, inhibition of blood vessel growth comprises a successful treatment for neovascular retinopathies. However, current therapeutic approaches targeting the vasculature have their limitations, indicating the need for more in depth knowledge of lymphangiogenesis and angiogenesis. To this end, we developed tools to study angiogenic and lymphangiogenic processes and investigated the involvement of endogenous mediators in developmental angiogenesis and lymphangiogenesis.

Semaphorin (Sema) 3a is a known repellent during axon guidance and has been shown to influence pathological angiogenic processes in eyes affected by proliferative retinopathies. Expression levels of Sema3A and its receptor neuropilin 1 are higher in tip cells (specialized endothelial cells that guide the growing blood vessels) than in the following stalk cells, suggesting that autocrine Sema3A signaling loops are involved in angiogenic sprouting. We investigated the expression pattern and functional role of endothelial cell-derived Sema3A in developmental retinal angiogenesis. To this end, we generated constitutive and tamoxifen-inducible endothelial cell-specific Sema3A knockout mice. We found that endothelial cell-derived Sema3A specifically reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) -A-induced tip cell filopodia formation and length. This signaling loop cannot be compensated by paracrine sources of Sema3A.

In the second project, we first studied the time course of developmental

lymphatic vessel growth of the so-called submesothelial initial diaphragmatic lymphatic plexus on the pleural side of the murine diaphragm. We used this knowledge to develop a reliable and quantifiable model for physiological lymphangiogenesis in vivo as well as an approach to measure lymphatic vessel drainage in newborn mice. We used this model to find that the lymphangiogenic growth on the pleural side of the diaphragmatic muscle is highly dependent on vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 whereas VEGFR-1 and -2 have no significant impact. Moreover, using colony stimulating factor-1 receptor (Csf-1r) deficient mice and therapeutic depletion of Csf-1r with blocking antibodies, we found that macrophages restrain lymphatic vessel branch formation without influencing lymphatic vessel drainage function during development.

In conclusion, in this thesis we provide novel tools for the study of angiogenic and lymphangiogenic processes. The more detailed knowledge about the repellent functions of endothelial cell-derived Sema3A may help to find novel therapeutic approaches for disorders such as proliferative retinopathies, since the number of tip cells and of filopodia per tip cell are highly increased during pathological angiogenesis. We propose that the diaphragm model can help to increase the knowledge about the physiological control of lymphangiogenesis and to discover new targets for anti- and pro-lymphangiogenic therapies.

## ZUSAMMENFASSUNG

Unter physiologischen Bedingungen spielen Blut- und Lymphgefäße in Vertebraten wichtige Rollen und regulieren unter anderem den Transport von Flüssigkeiten, Gasen, Zellen und Makromolekülen. Zudem beeinflussen sie fundamental pathologische Prozesse wie Krebs und chronische Entzündungen und stellen somit vielversprechende therapeutische Ziele dar. Tatsächlich sind anti-angiogene Therapien in neovaskulären Retinopathien erfolgreich, zeigen aber in anderen Anwendungsbereichen geringe Effekte.

Neue Erkenntnisse über angiogene und lymphangiogene Prozesse können in Zukunft zur Entwicklung von neuen Therapien oder zur Verbesserung bestehender Therapien beitragen. Darum entwickelten wir neue Tools für das Studium der vaskulären Entwicklung und erforschten mit deren Hilfe die Rollen neuer Faktoren während der Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßen.

Der bekannte Axon Guidance-Faktor Semaphorin (Sema) 3A spielt während pathologischen, angiogenen Prozessen in proliferativen Retinopathien eine Rolle. Zudem legen neue Studien den Schluss nahe, dass autokrine Sema3A-Signalketten die Sprossung von neuen Blutgefäßen beeinflussen, da Sema3A und der relevante Rezeptor Neuropilin 1 in Tipzellen (spezialisierte Endothelzellen, welche wachsende Blutgefäße anführen) höher exprimiert werden, als in den nachfolgenden Stalkzellen.

Mit Hilfe von konstitutiven und Tamoxifen-induzierbaren endothelzellspezifischen Sema3A knockout Mäusen sind wir dieser Fragestellung nachgegangen, und haben während der Entwicklung der retinalen Blutgefäße die Expressionsmuster und die Funktion des von endothelzell-kommenden Sema3A

studiert. Unter diesen Bedingungen reduziert Sema3A die Bildung von VEGF-A-induzierten Filopodien und deren Länge.

Im zweiten Projekt studierten wir den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des sogenannten submesothelialen initialen diaphragmatischen lymphatischen Plexus auf der pleuralen Seite des diaphragmatischen Muskels. Dieses Wissen nutzten wir für die Entwicklung eines Modells zur zuverlässigen Quantifizierung der physiologischen lymphangiogenen Prozesse wie auch für die Entwicklung einer Methode zur Messung der Drainage-Funktion lymphatischer Gefäße in Neugeborenen. Wir validierten das Modell mit dem Nachweis, dass die Entwicklung dieser lymphatischen Gefäße stark von VEGFR-3 abhängig ist, dem bekannten Mediator lymphangiogener Prozesse. Desweiteren zeigten wir, dass VEGFR-1 und -2 keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Lymphgefäße haben und dass in diesem Modell die Makrophagen zwar die Verästelung der lymphatischen Gefäße reduzieren, aber nicht die Drainage-Funktion der sich entwickelnden lymphatischen Gefäße beeinflussen.

Wir hoffen, dass diese neuen Tools in Zukunft dabei helfen, angiogene und lymphangiogene Prozesse zu studieren. Zudem können die neuen Erkenntnisse über die inhibierende Funktion von endothelzell-spezifischen Sema3A auf Tipzellen helfen, neue therapeutische Ansätze für proliferative Retinopathien zu finden, da während dieser Krankheiten die Anzahl von Tipzellen sowie die Anzahl von Filopodien pro Tipzelle stark erhöht sind. Darüber hinaus könnte das Diaphragma-Modell weiterhin bei der Untersuchung physiologischer lymphangiogener Prozesse, und der Entdeckung neuer anti- und pro-angiogener Therapien helfen.