



Doctoral Thesis

Systems immunological analysis of fibroblastic stromal cell phenotype and function

Author(s):

Novkovic, Mario

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010811737> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS ETH NO. 23902

**Systems immunological analysis of fibroblastic
stromal cell phenotype and function**

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

presented by

Mario Novkovic

Mag. Phys., University of Split, Croatia

born on 09.12.1986

citizen of Croatia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Annette Oxenius

Prof. Dr. Burkhard Ludewig

Prof. Dr. Ernst Hafen

Prof. Dr. Melanie Greter

2016

1 Summary

Secondary lymphoid organs (SLOs) have developed segregated niches that are able to initiate and maintain effective immune responses. Such global organization requires tight control of diverse cellular components and processes, specifically those that regulate lymphocyte trafficking, recognition of antigen and development of humoral and adaptive immunity. One example of SLOs are lymph nodes (LNs), which comprise of such micro-environmental niches populated by hematopoietic and stromal cells. The intricate interactions between these cell types determine the outcome of immune responses. Fibroblastic reticular cells (FRCs) form a densely interconnected stromal network in LNs and provide key factors necessary for T cell migration and retention, namely the chemokines CCL19 and CCL21, and the survival factor IL-7. In conjunction with various adhesion molecules, the stromal network thus fosters subsequent interactions between T cells and antigen-loaded dendritic cells (DCs). Other fibroblastic stromal cell populations such as the cancer-associated fibroblasts (CAFs) have been implicated in eliciting pro- and anti-tumor activities and how those relate to tumor cell survival and immune responsiveness. CAFs represent a highly heterogeneous stromal cell population in the tumor microenvironment (TME) with direct involvement in cancer immunity. With such critical roles in diverse immune scenarios, FRCs have been extensively studied in recent years. However, an understanding of their organization and functions under different pathological conditions has not been fully explored. Therefore, it is crucial to investigate the involvement of FRCs in regulation and modulation of immune reactions.

Development of integrative systems biology approaches has made it possible to elucidate the multi-level complexity of the immune system. One approach involves whole genome transcriptomic analysis via microarray technology. Comprehensive genomic analyses offer us insights in understanding global differential gene expression profiles of the heterogeneous cell populations involved in development of anti-viral or anti-tumor immune

responses. Another methodology includes a graph theory-based analysis of stromal networks involved in these processes. Topological analysis of biological networks provides a global description of the underlying structural organization, quantitative measures of network robustness and how that relates to overall organ functionality.

In order to investigate the tumor-suppressive role of CAFs, we sorted stromal cells from the human non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) and healthy fibroblasts from adjacent lung tissue. Transcriptomic characterization of fibroblasts from human NSCLC revealed a complex differential gene program indicating immune suppression and trans-differentiation into a fibrotic phenotype characterized by expression of extracellular matrix components typically associated with many tumor types. Conversely, CCL19 expression was higher in CAFs and it was correlated with CD8⁺ T cell infiltration, suggesting a possible compensation mechanism for tumor control. To further investigate the role of CCL19, we resorted to the Lewis Lung Cancer (LLC) model in mice expressing *Cre*-recombinase under the control of the *Ccl19* promoter (*Ccl19-cre^{eyfp}*). It was shown in this model that immunogenic tumors foster a mesenchymal CCL19-producing CAF niche capable of restraining tumor growth. Autologous CAFs were sorted and analyzed for differential gene expression. The cross-species transcriptomic analysis revealed a shared expression pattern between species in the lung cancer microenvironment.

A second major aim of this study was to determine the topological properties of the LN FRC network and how it is associated with immune functionality. By utilizing high-resolution microscopy coupled with 3D reconstruction and computational approaches to complex network analysis in *Ccl19-cre^{eyfp}* mice, we determined the morphological and topological properties of the FRC network. The underlying structure of the FRC network has been identified as a small-world network analogous to many other biological networks. This finding suggested that FRCs do not merely connect randomly into a cellular network in the LN paracortex, but actually form an ordered latticed structure, which has biological

implications for the functionality of such a network. Moreover, we demonstrate that this distinct structural organization is an imprinted trait of the FRC network, which is capable of fully regenerating after complete FRC ablation in *Ccl19-cre^{eyfp/idtr}* mice. Partial ablation of FRCs indicated the existence of a threshold point for the LN when it becomes functionally impaired. *In silico* perturbation analysis of the FRC network confirmed that LNs are able to tolerate FRC loss of approximately 50%. Subsequent *in vivo* experiments corroborated these findings by demonstrating substantial impairment of immune cell recruitment, migration and DC-mediated activation of antiviral CD8⁺ T cells, after critical loss of FRCs. Taken together, these results revealed the extraordinary topological robustness of the FRC network, crucial for establishing effective immunity in LNs.

In conclusion, fibroblastic stromal cells represent a heterogeneous cell population that is not only able to exert its biological functions in regulating immune responses, but also more fundamentally its inherently organized structure can influence immune cell behavior. Future research will reveal more details about stromal networks in other microenvironments and under different pathological conditions.

2 Zusammenfassung

In sekundären lymphatischen Organen (SLO) haben sich Nischen entwickelt in denen Immunreaktionen ausgelöst und erhalten werden können. Diese strukturelle Organisation benötigt eine Kontrolle diverser zellulärer Komponenten und Prozesse, speziell solcher, die die Migration von Lymphozyten, Erkennung von Antigenen und die Entwicklung von humoralen und adaptiven Immunantworten regulieren. Ein Beispiel für SLO sind Lymphknoten (LK), in denen Nischen von hämatopoetischen Zellen und Stromazellen gebildet werden. Die komplexen Interaktionen zwischen diesen Zelltypen bestimmen den Ausgang von Immunantworten. In Lymphknoten bilden fibroblastische Retikulumzellen (fibroblastic reticular cells, FRCs) ein dichtes miteinander verbundenes stromales Netzwerk. Dabei produzieren FRCs entscheidende Faktoren, wie die Chemokine CCL19 und CCL21 und den Wachstumsfaktor IL-7. Durch Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle unterstützt das stromale Netzwerk Interaktionen zwischen T Zellen und Antigen beladenen dendritischen Zellen (DZ). Für andere fibroblastische Zellpopulationen, wie zum Beispiel tumor assoziierte Fibroblasten (cancer-associated fibroblasts, CAFs) wurden pro- und anti-tumorale Aktivitäten beschrieben, die im Zusammenhang mit dem Überleben von Tumorzellen und dem Auslösen von Immunantworten stehen. CAFs repräsentieren eine sehr heterogene stromale Zellpopulation in der Tumormikroumgebung (tumor microenvironment, TME) mit direkter Beteiligung an der Tumormunität. Aufgrund dieser bedeutenden Funktionen in diversen Antworten des Immunsystems wurden FRCs in den letzten Jahren eingehend studiert. Allerdings wurden Organisation und Funktionen von FRCs unter verschiedenen pathologischen Bedingungen noch nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb ist es wichtig, die Beteiligung von FRCs bei der Regulation von Immunreaktionen zu erforschen.

Die Entwicklung von integrativen systembiologischen Ansätzen ermöglichte es, die mehrstufige Komplexität des Immunsystems aufzuklären, unter anderen durch die Analyse

des gesamten Transkriptoms mit Hilfe von Mikroarray basierter Technologie. Durch umfangreiche genomische Analysen war es möglich, differentiell exprimierte Genexpressionsprofile von heterogenen Zellpopulationen, die an der Entwicklung von antiviralen und anti-tumoralen Immunantworten beteiligt sind, zu verstehen. Weitere Methoden umfassten die Graphtheorie basierte Analyse von stromalen Netzwerken, die an diesen Prozessen beteiligt sind. Topologische Analysen von biologischen Netzwerken lieferten eine umfassende Beschreibung der strukturellen Organisation und der Stabilität des Netzwerks und in Bezug zur Organfunktionalität.

Um die tumor-suppressive Funktion von CAFs zu analysieren, wurden Stromazellen aus dem Gewebe vom nicht-kleinzelligen Lungentumoren (non-small cell lung carcinoma, NSCLCs) und aus umliegenden gesundem Lungengewebe isoliert. Transkriptomanalyse der Fibroblasten aus dem NSCLC ergaben ein komplexes differentielles Genprogramm, das auf Immunsuppression und Transdifferenzierung zu einem fibrotischen Phänotyp hinweisen. Dies zeigte sich vor allem durch die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix, die typischerweise im Zusammenhang mit weiteren Tumortypen stehen. Im Gegenzug dazu war die Expression von CCL19 höher in CAFs und korrelierte zugleich mit der Infiltration von CD8⁺ T Zellen in den Tumor. Dieser Befund weist auf einen möglichen Kompensationsmechanismus zur Kontrolle des Tumors hin. Um die Funktion von CCL19 weiter zu untersuchen, verwendeten wir das murine Lewis Lung Tumor Modell (Lewis Lung Cancer, LLC) in transgenen Mäusen, die unter der Kontrolle des *Ccl19* Promoters eine Cre-Rekombinase (*Ccl19-cre^{ex/p}*) exprimieren. Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass immunogene Tumore eine mesenchymale CAF Nische aufweisen, die CCL19 produzieren und das Tumorstadium einschränken können. Die CAFs wurden aus diesen Tumoren isoliert und auf differentielle Genexpression analysiert. Die Spezies-übergreifende transkriptomische Analyse zeigte ein gemeinsames Expressionsmuster in der Lunge und der Tumormikroumgebung.

Ein zweites Ziel dieser Studie war es die topologischen Eigenschaften des LK FRC Netzwerkes zu bestimmen und die Netzwerktopologie im Zusammenhang mit der Funktionalität des Immunsystems zu untersuchen. Durch Verwendung von hochauflösender Mikroskopie, 3D Rekonstruktion und rechnergestützten Analysen des Netzwerkes in *Ccl19-cre^{eyfp}* Mäusen, konnten wir morphologische und topologische Eigenschaften des FRC Netzwerkes ermitteln. Dabei wurde die vorliegende Struktur des FRC Netzwerkes als ein „Klein-Welt“ Netzwerk (small world network) identifiziert, was im Einklang mit vielen anderen biologischen Netzwerken steht. Diese Daten implizieren, dass FRCs im LK Parakortex kein beliebiges zelluläres Netzwerk bilden, sondern eine geordnete gitterartige Struktur formen, die biologische Folgen für die Funktionalität eines solchen Netzwerkes mit sich bringt. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die strukturelle Organisation ein bestimmendes Merkmal des FRC Netzwerkes ist, das auch nach vollständiger Ablation der FRCs wieder komplett hergestellt wird. Partielle Ablation der FRCs zeigte die Existenz eines Schwellenwertes für die LK Funktionalität hin. Eine Simulation Zerstörung des FRC Netzwerkes bestätigte, dass LK einen Verlust von circa 50% der FRCs tolerieren können. Anschliessende in vivo Experimente bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass nach dem Verlust der FRCs die Rekrutierung von Immunzellen, die Migration und die DZ-vermittelte Aktivierung anti-viraler CD8⁺ T Zellen beeinträchtigt sind. Somit zeigten diese Ergebnisse eine aussergewöhnliche topologische Stabilität des FRC Netzwerkes, die entscheidend für eine effektive Immunität im LK ist.

Diese Studien zeigen, dass fibroblastische Stromazellen eine heterogene Zellpopulation darstellen, die grundlegende Strukturen in SLO bilden und das Verhalten von Immunzellen beeinflussen. Zukünftige Untersuchungen werden weitere Details über stromale Netzwerke in anderen Mikroumgebungen enthüllen und den Einfluss dieser Zellen auf verschiedene pathologische Prozesse zeigen.