

DISS. ETH NO. 28287

**Investigating the mechanosensing phenotype of lymphatic
endothelial cells and its implications for leukocyte trafficking**

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

Presented by
Ioannis Kritikos

M.Sc. in Molecular Life Sciences
with special qualification in Microbiology/Immunology
University Bern, Switzerland

Born on 24.07.1992
Citizen of Greece

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Cornelia Halin Winter
Prof. Dr. Michael Detmar

2022

1. Summary

1.1. Summary

The lymphatic vasculature plays important roles in tissue fluid homeostasis and in the induction and regulation of adaptive immunity. It is a vascular system parallel to the blood vasculature, transporting tissue fluid, macromolecules, antigens and immune cells - collectively termed lymph - from peripheral tissues back to the blood circulation. Interstitial fluid and macromolecules are taken up through blind-ended lymphatic capillaries present in virtually all peripheral tissues. Lymphatic capillaries will subsequently merge into collecting vessels, where lymph flow becomes higher due to vessel contractions. On its way back to the blood vasculature, the lymph is transported through numerous lymph nodes (LNs), i.e. sites where adaptive immune reactions are elicited.

Research of the past 15 years has revealed that T cells and dendritic cells (DCs) migrate through afferent lymphatic vessels (LVs) in a step-wise manner. Upon entry into lymphatic capillaries they crawl within the capillaries, until they reach more downstream collecting vessels. There, due to vessel constrictions and the higher lymph flow, immune cells detach and transition from an active migration to a passive, yet more rapid transport with the lymph flow towards the next draining LN (dLN). This multistep process of leukocyte migration illustrates the importance of lymphatic flow in ensuring rapid and efficient arrival of immune cells in dLNs. In addition to this direct contribution to leukocyte and fluid transport, lymphatic flow is also known to influence the gene expression of the vessel-lining lymphatic endothelial cells (LECs). However, only few studies have thus far investigated the impact of flow on the LEC phenotype *in vitro* in a comprehensive manner. Therefore, in this work, we set out to address this question as well as to investigate the function of one specific flow-induced molecule in T cell trafficking.

In a first study we investigated the contribution of the atypical chemokine receptor 4 (ACKR4) to T cell migration through afferent LVs. ACKR4 is known to scavenge the chemokines CCL21 and CCL19, which are ligands of the chemokine receptor CCR7 that is of prime importance for DC and T cell migration through afferent LVs. We found that ACKR4 is not expressed in capillaries but rather in downstream collecting LVs. Performing *in vitro* shear stress experiments and studies in a murine lymphedema model we could demonstrate that ACKR4 expression in lymphatic collectors is induced by flow. *In vivo* uptake studies with fluorescently labeled chemokines confirmed that ACKR4 in collectors was functional and could mediate the uptake of both CCL19 and CCL21. We hypothesized that the role of ACKR4 in collectors might be to remove chemokine from the luminal collector surface in order to induce de-adhesion of actively migrating T cells from the collector surface and their transition to rapid, passive transport towards the dLN with the lymph flow. To address this, we performed tissue whole mount studies in inflamed mouse ears of homozygous ACKR4-deficient mice and ACKR4 heterozygous mice, retaining one functional copy of ACKR4. While T cell entry into lymphatic capillaries was not affected by loss of ACKR4, we observed an accumulation of CD4⁺ T cells

in collecting LVs of ACKR4-deficient mice compared to ACKR4 heterozygous mice. Furthermore, we could demonstrate in two different types of *in vivo* migration studies that the overall migration of T cells via afferent LVs to dLNs was compromised in absence of ACKR4. Taken together, we identified a new role for flow-induced ACKR4 in LV collectors to promote T cell deadhesion and migration towards dLNs.

In a second project, we performed a transcriptomic analysis to further investigate the *in vitro* shear stress response of human dermal lymphatic endothelial cells (HDLECs), as to date this has not been comprehensively studied. To this end, HDLECs were exposed to two different types of flow, namely, laminar and oscillatory flow, which are generally thought to mimic conditions in different regions of lymphatic collectors. In our transcriptomic analysis we found many known pan-endothelial and lymphatic-specific shear responsive genes to be upregulated by flow, confirming the quality of the dataset. Interestingly, we observed that shear stress modulated the expression levels of various adhesion molecules (e.g. ICAM-1, ESAM, CLEVER-1) and chemokines (e.g. CCL21, CXCL12, CX3CL1, CCL2) with known roles in leukocyte migration through afferent lymphatics. To better understand to which extent shear stress shapes the gene expression pattern of LECs, we compared our dataset with a published transcriptomic analysis from our group of LECs isolated from murine dermal capillaries and collectors (Arasa, Collado-Diaz, Kritikos et al., 2021). We observed that 37% of genes found to be preferentially expressed in dermal collector LECs were also significantly upregulated in our flow-experiments. In the case of genes preferentially expressed in capillary LECs, 61% were found to be down-regulated by flow in our experiments. These findings identify shear stress as a major contributor to the identity of LECs in lymphatic capillaries and collectors.

Taken together, our data show that the mechanosensitive chemokine scavenging receptor ACKR4 has an important role in T cell migration. By its expression in the LV compartments with exposure to higher shear stress than the initial lymphatic capillaries, it scavenges chemokines, facilitating T cell trafficking through the LVs. Moreover, we generated a reference transcriptomic study of HDLECs exposed to shear stress, which will enable future elucidation of the LEC phenotype.

1.2. Zusammenfassung

Das Lymphgefäßssystem spielt eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Gewebeflüssigkeit und bei der Induktion und Regulierung der adaptiven Immunität. Es handelt sich um ein Gefäßsystem, das parallel zu den Blutgefäßen verläuft und Gewebeflüssigkeit, Makromoleküle, Antigene und Immunzellen - zusammenfassend als Lymphe bezeichnet - aus den peripheren Geweben zurück in den Blutkreislauf transportiert. Die interstitielle Flüssigkeit und die Makromoleküle werden von den blinden lymphatischen Kapillaren aufgenommen, die in praktisch allen peripheren Geweben vorhanden sind. Die lymphatischen Kapillaren gehen anschliessend in lymphatischen Kollektoren über, in denen der Lymphfluss aufgrund von Gefäßkontraktionen verstärkt wird. Auf dem Rückweg zum Blutgefäßssystem wird die Lymphe durch zahlreiche Lymphknoten transportiert, d. h. durch Stellen, an denen adaptive Immunreaktionen ausgelöst werden.

Die Forschung der letzten 15 Jahre hat gezeigt, dass T-Zellen und dendritische Zellen schrittweise durch afferente Lymphgefäße wandern. Nach dem Eintritt in die lymphatischen Kapillaren kriechen sie innerhalb der Kapillaren, bis sie weiter stromabwärts gelegene Kollektoren erreichen. Dort lösen sich die Immunzellen aufgrund von Gefäßverengungen und des höheren Lymphflusses ab und gehen von einer aktiven Wanderung zu einem passiven, aber schnelleren Transport mit dem Lymphstrom in Richtung des nächsten Lymphknotens über. Dieser mehrstufige Prozess der Leukozytenwanderung veranschaulicht die Bedeutung des Lymphflusses für die schnelle und effiziente Ankunft von Immunzellen in den Lymphknoten. Neben diesem direkten Beitrag zum Leukozyten- und Flüssigkeitstransport ist bekannt, dass der Lymphfluss auch die Genexpression der das Gefäß auskleidenden lymphatischen Endothelzellen (LECs) beeinflusst. Allerdings haben bisher nur wenige Studien den Einfluss des Flusses auf den LEC-Phänotyp *in vitro* umfassend untersucht. Daher haben wir uns in dieser Arbeit dieser Frage gewidmet und die Funktion eines spezifischen, durch den Fluss induzierten Moleküls im T-Zell Wanderung untersucht.

In einer ersten Studie untersuchten wir den Beitrag des atypischen Chemokinrezeptors 4 (ACKR4) zur Migration von T-Zellen durch afferente Lymphgefäße. ACKR4 ist dafür bekannt, dass er die Chemokine CCL21 und CCL19 abfängt, die Liganden des Chemokinrezeptors CCR7 sind, der für die Migration von DC- und T-Zellen durch afferente Lymphgefäße von grösster Bedeutung ist. Wir fanden heraus, dass ACKR4 nicht in Kapillaren, sondern in Kollektoren exprimiert wird. Durch *In-vitro* Shear Stress Experimente und Studien in einem Lymphödemmodell bei Mäusen konnten wir zeigen, dass die Expression von ACKR4 in den Kollektoren durch Strömung induziert wird. *In-vivo* Studien mit fluoreszenzmarkierten Chemokinen bestätigten, dass ACKR4 in den Kollektoren funktionell ist und die Aufnahme von CCL19 und CCL21 vermitteln kann. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Rolle von ACKR4 in Kollektoren darin bestehen könnte, Chemokine von der luminalen Kollektoroberfläche zu entfernen, um die De-Adhäsion aktiv wandernder T-Zellen von der Kollektoroberfläche und ihren Übergang zu einem schnellen, passiven Transport in Richtung des Lymphknotens mit dem Lymphfluss zu bewirken. Um diese Frage zu klären, haben wir Mikroskopiestudien an entzündeten Mäuseohren

von homozygoten ACKR4-defizienten Mäusen und von ACKR4-heterozygoten Mäusen durchgeführt, die eine funktionelle Kopie von ACKR4 behalten haben. Während der Eintritt von T-Zellen in die Kapillaren durch den Verlust von ACKR4 nicht beeinträchtigt wurde, beobachteten wir eine Anhäufung von CD4⁺ T-Zellen in den Kollektoren von ACKR4-defizienten Mäusen im Vergleich zu ACKR4-heterozygoten Mäusen. Darüber hinaus konnten wir in zwei verschiedenen Arten von *In-vivo* Migrationsstudien zeigen, dass die gesamte Migration von T-Zellen über afferente Lymphgefäße zu den Lymphknoten in Abwesenheit von ACKR4 beeinträchtigt war. Insgesamt konnten wir eine neue Rolle für das strömungsinduzierte ACKR4 in Kollektoren zur Förderung der T-Zell De-Adhäsion und der Migration zu den Lymphknoten identifizieren.

In einem zweiten Projekt führten wir eine transkriptomische Studie durch, um die *In-vitro* Reaktion menschlicher Haut lymphatischer Endothelzellen (HDLECs) auf Shear Stress weiter zu untersuchen, da diese bisher noch nicht umfassend untersucht wurde. Zu diesem Zweck wurden die HDLECs zwei verschiedenen Strömungsarten ausgesetzt, nämlich einer laminaren und einer oszillierenden Strömung, von denen allgemein angenommen wird, dass sie die Bedingungen in den verschiedenen Regionen der lymphatischen Kollektoren nachahmen. In unserer Transkriptomanalyse fanden wir, dass viele bekannte endotheliale und lymphatische Gene, die auf Shear Stress reagieren, durch Strömung hochreguliert werden, was die Qualität des Datensatzes bestätigt. Interessanterweise beobachteten wir, dass Shear Stress die Expressionsniveaus verschiedener Adhäsionsmoleküle (z. B. ICAM-1, ESAM, CLEVER-1) und Chemokine (z. B. CCL21, CXCL12, CX3CL1, CCL2) moduliert, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Leukozytenmigration durch afferente Lymphgefäße spielen. Um besser zu verstehen, inwieweit Shear Stress das Genexpressionsmuster von LECs formt, verglichen wir unseren Datensatz mit einer von unserer Gruppe veröffentlichten Transkriptomanalyse von LECs, die aus Hautkapillaren und Hautkollektoren von Mäusen isoliert wurden (Arasa, Collado-Diaz, Kritikos et al., 2021). Wir stellten fest, dass 37% der Gene, die in Hautkollektor-LECs bevorzugt exprimiert wurden, auch in unseren Flow-Experimenten signifikant hochreguliert waren. Von den Genen, die bevorzugt in kapillaren LECs exprimiert werden, wurden in unseren Experimenten 61% durch Strömung herunterreguliert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Shear Stress einen wesentlichen Beitrag zur Identität der LECs in lymphatischen Kapillaren und Kollektoren leistet.

Insgesamt zeigen unsere Daten, dass der mechanosensitive Chemokin-Scavenging Rezeptor ACKR4 eine wichtige Rolle bei der Migration von T-Zellen spielt. Durch seine Expression in den lymphgefäße-Kompartimenten, die einer höheren Shear Stress-belastung ausgesetzt sind als die ursprünglichen lymphatischen Kapillaren, fängt ACKR4 Chemokine ab und erleichtert so die Wanderung von T-Zellen durch die Lymphgefäße. Darüber hinaus haben wir eine transkriptomische Referenzstudie von HDLECs erstellt, die Shear Stress ausgesetzt sind, was eine zukünftige Aufklärung des LEC-Phänotyps ermöglichen wird.