

DISS. ETH No. 19326

**The inflammatory response of
lymphatic endothelial cells:
Novel insights from *ex vivo*
transcriptional profiling**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Benjamin Vigl

Master of Science in Biology (Mag. rer. nat.)

University of Vienna, Austria

Born July 21, 1979

Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Cornelia Halin

Prof. Dr. Michael Detmar

2010

1.1 Summary

Lymphatic vessels play an important role in tissue homeostasis and immune surveillance, and are also involved in pathologic conditions such as tumor cell metastasis and inflammation. From research on blood vessels, it has been well described that inflammation induces changes in the expression of adhesion molecules and chemokines, which account for a rapid recruitment of leukocytes into the affected tissue. By contrast, it is presently not well understood how inflammatory signals activate lymphatic endothelial cells (LECs) and influence their function, in particular with respect to leukocyte migration into lymphatic vessels. The main aim of this thesis was to elucidate the gene expression profiles that are present in LECs *in vivo* under steady state compared to inflamed conditions. This was accomplished by performing a comprehensive transcriptional profiling analysis of LECs isolated *ex vivo* from uninflamed murine skin and from skin inflamed by the induction of a contact hypersensitivity response.

The gene array data obtained were of high quality, as evidenced by a high proportion of expressed genes and the presence of many pan-endothelial and LEC marker genes. In addition to previously described inflammation-induced genes like ICAM-1 and VCAM-1, several other adhesion molecules (e.g. P-selectin, CD44 and NrCAM) were found to be differentially expressed in LECs during inflammation. Intriguingly, inflammation led to the down-regulation of several LEC marker genes (i.e. Prox-1, LYVE-1 and VEGFR3). On the other hand, various genes involved in antigen presentation become upregulated, suggesting that inflammation may confer an antigen presenting function to LECs. One group of genes that was highly induced by inflammation were chemokines, in particular so-called inflammatory chemokines, which attract inflammatory cells. Notably, the pattern of chemokine induction was found to greatly depend on the nature of the inflammatory stimulus, suggesting that different cell types may be recruited into lymphatic vessels, depending on the type of inflammatory response.

Dendritic cells (DCs) are essential for the induction of an adaptive immune response. Their function is highly dependent on migration from the tissue into lymphatic vessels and onwards to draining lymph nodes (dLNs). The best known driver of DC migration to dLNs is the LEC-expressed chemokine CCL21, which binds to the CCR7 receptor expressed on DCs. Surprisingly, we observed that the chemokine CCL21 was strongly down-regulated at the mRNA level during inflammation, whereas, at the same time, CCL21 protein levels were approximately two-fold increased. *In vivo* DC

migration experiments, performed in uninflamed or inflamed skin of wild-type or CCR7^{-/-} mice, revealed that inflammation further increased the CCR7-dependency of DC migration into lymphatic vessels. However, inflammation also led to a moderate enhancement of DC migration in CCR7^{-/-} mice, indicating that, in addition CCR7 signaling, CCR7-independent mechanisms such as LEC expressed chemokines or adhesion molecules contribute to DC migration during inflammation.

In a second study, the role of the coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) in LEC biology was investigated. CAR is an inflammation regulated adhesion molecule, which we found to be expressed in human LECs *in vivo* and *in vitro*. To address the functional significance of CAR expression, we modulated CAR expression levels in cultured LECs *in vitro* by siRNA- and vector-based transfection approaches. Functional assays performed with the transfected cells revealed that CAR is involved in distinct cellular processes in LECs, such as cell adhesion, migration, tube formation and the control of permeability *in vitro*. In contrast, no effect of CAR on LEC proliferation was observed. Overall, our data suggest that CAR stabilizes LEC-LEC interactions in the skin and may contribute to lymphatic vessel integrity.

Collectively, the results of this dissertation provide novel insights into the molecular mechanisms of lymphatic vessels during inflammation and steady state conditions. They highlight the important role of lymphatic vessels in leukocyte trafficking, mediated by chemokines and adhesion molecules, and may provide valuable data for the design of novel anti-inflammatory therapies or vaccines.

1.2 Zusammenfassung

Lymphatische Gefäße spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Gewebsflüssigkeit und in der Immunabwehr, sind aber auch an pathologischen Prozessen, wie der Metastasierung von Tumorzellen oder an Entzündungsreaktionen beteiligt. In Blutgefäßen ist in grossem Detail bekannt, wie Entzündungen das Expressionsprofil von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen verändern und dadurch verstärkt Leukozyten in das betroffene Gewebe locken. Im Gegensatz dazu ist heutzutage weitgehend unbekannt, wie entzündliche Signale lymphatische Gefäße aktivieren und deren Funktion, insbesondere die Leukozytenmigration, beeinflussen. Das Ziel dieser Arbeit war es, das genaue genetische Programm zu erfassen, welches in lymphatischen Endothelzellen *in vivo* im entzündeten sowie im Ruhe Zustand aktiv ist. Hierzu wurde eine umfassende transkriptionelle Analyse von lymphatischen Endothelzellen durchgeführt, welche *ex vivo* aus unbehandelter oder durch Kontakthypersensitivität entzündeter Haut von Mäusen isoliert wurden.

Die analysierten Genchips waren von guter Qualität, da sie eine hohe Anzahl detektierbarer Gene sowie das Vorhandensein vieler Panendothel- und lymphatischer Endothelmarker aufzeigten. Nebst den bereits bekannten entzündungsinduzierten Genen ICAM-1 und VCAM-1, waren einige weitere Adhäsionsmoleküle (z.B. P-Selektin, CD44 und NrCAM) in der Entzündung auf lymphatischen Endothelzellen unterschiedlich exprimiert. Interessanterweise führte die Entzündung zu einer reduzierten Expression von wichtigen lymphatischen Endothelzell-spezifischen Genen (Prox-1, LYVE-1 und VEGFR3). Andererseits wurden verschiedene Gene mit beschriebener Funktion in der Antigenpräsentation stärker exprimiert, was auf eine mögliche, entzündungsinduzierte Funktion von lymphatischen Endothelzellen in der Antigenpräsentation hinweisen könnte. Chemokine stellten eine weitere Gruppe von Genen, die bei Entzündung stark induziert wurden. Insbesondere waren dies entzündliche Chemokine, welche entzündliche Leukozyten anlocken können.

Bemerkenswerterweise zeigte sich, dass das Muster der induzierten Chemokine von der Art des Entzündungssignals abhing. Es ist daher denkbar, dass je nach Art der Entzündungsreaktion, eine ganz spezifische Zusammensetzung von Leukozyten chemotaktisch in die lymphatischen Gefäße gelockt wird.

Dendritische Zellen sind unerlässlich für die Induktion einer adaptiven Immunantwort. Ihre Funktion ist stark davon abhängig, dass sie aus dem Gewebe in die lymphatischen Gefäße und weiter zum nächsten Lymphknoten wandern. Ein

wichtiges Molekül bei der Wanderung von dendritischen Zellen ist das Chemokin CCL21, welches von lymphatischen Endothelzellen gebildet wird und durch den CCR7 Rezeptor auf den dendritischen Zellen erkannt wird. Überraschenderweise beobachteten wir während der Entzündung eine reduzierte Transkription von CCL21 mit gleichzeitiger Verdoppelung des verfügbaren Proteins. Eine *in vivo* Untersuchung der Wanderung von dendritischen Zellen in Wildtyp oder CCR7^{-/-} Mäusen mit entweder unbehandelter oder entzündeter Haut zeigte, dass die Entzündung die Abhängigkeit der dendritischen Zellwanderung von CCR7 noch weiter verstärkte. Jedoch führte die Entzündung auch zu einem moderaten Anstieg der dendritischen Zellwanderung in CCR7^{-/-} Mäusen. Dies könnte bedeuten, dass es nebst dem CCR7-abhängigen auch einen CCR7-unabhängigen Mechanismus – z.B. hervorgerufen durch die Expression von Chemokinen oder Adhäsionsmolekülen in lymphatischen Endothelzellen – gibt.

In einer zweiten Studie wurde die Rolle von CAR (coxsackie- and adenovirus receptor) in lymphatischen Endothelzellen ermittelt. CAR ist ein Adhäsionsmolekül, dessen Expression wir auf humanen lymphatischen Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* nachweisen konnten. Um die funktionale Bedeutung von CAR zu erfassen, veränderten wir die Expression von CAR in kultivierten lymphatischen Endothelzellen durch siRNA- und Vektortransfektionen. Funktionale Tests zeigten, dass CAR *in vitro* an verschiedenen zellulären Prozessen wie der Adhäsion, der Migration, der Permeabilität und der Bildung von gefässartigen Strukturen beteiligt ist. Jedoch fanden wir keinen Effekt von CAR auf die Proliferation von lymphatischen Endothelzellen. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass CAR die Interaktionen zwischen lymphatischen Endothelzellen in der Haut unterstützt und möglicherweise zur Struktur der Lymphgefäße beiträgt.

Insgesamt vermitteln die Resultate dieser Doktorarbeit ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen von Lymphgefäßen unter normalen und entzündlichen Bedingungen. Des Weiteren unterstreichen sie die Rolle der lymphatischen Gefäße in der Wanderung von Leukozyten durch die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, und könnten auch für die Entwicklung von neuen entzündungshemmenden Therapien oder Impfungen von Nutzen sein.