

DISS. ETH NO. 24897

**The roles of lymphatic vessels in distant organ metastasis and in
fluid outflow from the central nervous system under physiological
and pathological conditions**

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

presented by
QIAOLI MA

MSc Life Sciences and Technologies
École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)

born on 26. 01. 1986
citizen of People's Republic of China

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

2018

1 Summary

1.1 Summary

Lymphatic vessels do not only exert vital functions in tissue fluid homeostasis, immune surveillance and dietary lipids uptake, but they are also involved in the pathogenesis of many diseases, including inflammation, lymphedema and cancer. In this dissertation, we investigated the roles of lymphatic vessels in distant organ metastasis and in the fluid outflow from the central nervous system under physiological and pathological conditions.

Lymphatic vessels play important roles in cancer metastasis. Their pro-metastatic roles in primary tumors and in sentinel lymph nodes have been extensively studied, whereas their roles in distant organ metastasis have remained largely unexplored. In the first project, we found that lymphangiogenesis was induced at the site of distant metastasis, using an experimental breast cancer model with spontaneous metastases in the lung. Metastatic tumor cells in lungs were able to enter local lymphatic vessels and to migrate to lung-draining lymph nodes. In a retrospective study with a cohort of melanoma patients with lung metastases, we found that high lymphatic density and presence of lymphatic invasion in the lung correlated with poor patient outcome. In a transgenic mouse model with expanded lymphatics in the lung, we detected increased growth of lung metastases and increased dissemination to other organs. These results indicate that as in the primary tumor, lymphatic vessels also play an important role at distant metastatic sites, supporting the growth and further dissemination of metastatic cancer cells. Thus, anti-lymphangiogenic treatments might be beneficial for patients with highly metastatic cancers.

In the second project, we characterized the anatomical routes and dynamics of outflow of cerebrospinal fluid (CSF) using lymphatic-reporter mice, near-infrared fluorescent tracer and high-resolution stereomicroscopy. After infusion into a lateral ventricle of the brain, tracers rapidly spread into the subarachnoid space (SAS), flowed along perineural routes and exit the cranium through foramina in the skull, where they were taken up by an extensive network of lymphatic vessels outside of the central nervous system (CNS) and transported to both

mandibular and deep cervical lymph node groups. Several cranial nerves were identified to provide the perineural pathways for tracers to exit the skull. Beside the previously reported olfactory nerve (CN I) and the optic (CN II) nerve, we found that the trigeminal nerve (CN V), the glossopharyngeal (CN IX) nerve, the vagus (CN X) nerve, the accessory (CN XI) nerve and the facial nerve (CN VII) also present a perineural outflow pattern. After infusion of tracers into a lateral ventricle, we quantified the transport of tracers to the blood and lymph nodes using noninvasive imaging techniques, and we imaged the tracer signal at the posterior facial vein, which is the major venous outflow route for blood from the brain. Importantly, these studies revealed that for both macromolecular and small molecule tracers, lymph transport is the predominant route for CSF outflow from SAS but not the commonly accepted route through arachnoid villi. Additionally, we detected a reduction of lymphatic outflow of CSF in aged compared to young mice, suggesting that the lymphatic system may represent a new therapeutic target for age-associated neurological conditions.

Glioblastoma is a malignant brain tumor with an overall average patient survival of less than 15 months. The intracranial hypertension caused by the associated brain edema induces severe headaches in glioblastoma patients and dramatically decreases their life quality. To seek for potential therapeutic strategies, it is essential to assess the changes in the fluid outflow from the CNS under the pathological condition of glioblastoma. In the third project, by quantifying the transport of tracers to the blood and to the brain-draining lymph nodes after tracer infusion into a lateral ventricle or the brain parenchyma, we found that the fluid outflow from the CNS was significantly reduced in glioblastoma-bearing mice. The paravascular pathways were impaired and the expression of the water channel protein aquaporin 4 was not detectable in the tumor mass and its polarized expression was disrupted in the tumor periphery. Dexamethasone treatment, which is commonly applied to reduce the brain edema, improved the fluid outflow from the CNS. These findings indicate that impaired fluid outflow is closely related to brain edema and that therapeutic measures to improve the fluid outflow might reduce the complications in glioblastoma patients.

In conclusion, we revealed the important roles of lymphatic vessels in distant organ metastasis and fluid outflow from the CNS under physiological conditions, ageing and glioblastoma. Therefore, therapeutic strategies targeting lymphatic vessels might be beneficial for patients with highly metastatic cancers and patients with neurological disorders.

1.2 Zusammenfassung

Lymphgefäße üben nicht nur eine zentrale Funktion in der Homöostase der Gewebeflüssigkeit, der Immunüberwachung und der Aufnahme von Lipiden aus der Ernährung aus, sondern sind auch an der Pathogenese vieler Krankheiten beteiligt; dazu gehören Entzündung, Lymphödem und Krebs. In dieser Dissertation untersuchten wir die Rolle der Lymphgefäße in der Fernmetastasierung und in der Drainage des zentralen Nervensystems unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Lymphgefäße spielen eine wichtige Rolle in der Krebsmetastasierung. Ihre prometastatische Rolle in Primärtumoren und in Wächterlymphknoten wurden ausgiebig untersucht, während ihre Rolle in der Fernmetastasierung weitgehend unerforscht blieb. Im ersten Projekt entdeckten wir, dass Lymphangiogenese am Ort von Fernmetastasen hervorgerufen wurde, indem wir ein experimentelles Brustkrebsmodell mit spontanen Lungenmetastasen einsetzten. Metastatische Tumorzellen in den Lungen waren in der Lage, in lokale Lymphgefäße einzudringen und zu den Lungen-drainierenden Lymphknoten zu migrieren. In einer retrospektiven Studie mit einer Kohorte von Melanompatienten mit Lungenmetastasen stellten wir fest, dass eine hohe Lymphgefäßdichte und das Vorhandensein lymphatischer Invasion in der Lunge mit einer schlechten Patienten-Prognose korrelierten. In einem transgenen Mausmodell mit vermehrten Lymphgefäßen in den Lungen stellten wir erhöhtes Wachstum von Lungenmetastasen und verstärkte Ausbreitung in andere Organe fest. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lymphgefäße, ähnlich wie im Primärtumor, auch in Fernmetastasen eine Rolle spielen, indem sie das Wachstum sowie die weitere Ausbreitung der metastatischen Krebszellen unterstützen. Folglich könnten antilymphangiogene Behandlungen für Patienten mit metastatischem Krebs nützlich sein.

Im zweiten Projekt charakterisierten wir die anatomischen Routen und die Dynamik des Abflusses der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) mit Hilfe von lymphatischen Reporter-mäusen, Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Tracern, und hochauflösender Stereomikroskopie. Nach Infusion in einen Seitenventrikel des Gehirns verbreiteten sich die Tracer schnell in den Subarachnoidalraum, flossen entlang perineuralen Routen und verließen die Schädelkapsel durch Foramina im Schädel, wo sie von einem umfangreichen Lymphgefäßnetzwerk ausserhalb des zentralen Nervensystems aufgenommen wurden und zu den submandibulären Lymphknoten und zu den tiefen Halslymphknoten transportiert wurden. Der perineurale

Tracertransport erfolgte entlang mehrerer Hirnnerven. Zusätzlich zu den bisher als Abflussrouten bekannten Hirnnerven, dem Nervus olfactorius (CN I) und dem Nervus opticus (CN II), stellten wir fest, dass auch der Nervus trigeminus (CN V), der Nervus glossopharyngeus (CN IX), der Nervus vagus (CN X), der Nervus accessorius (CN XI) sowie der Nervus facialis (CN VII) perineurale Abflussmuster zeigten. Nach Infusion der Tracer in einen Seitenventrikel quantifizierten wir mit nicht-invasiven bildgebenden Verfahren den Transport der Tracer in das Blut und in die Lymphknoten, und beobachteten das Tracer-Signal in der hinteren Gesichtsvene, welche die venöse Hauptabflussroute des Blutes aus dem Gehirn darstellt. Diese Studien zeigten, dass sowohl für makromolekulare als auch für niedrigmolekulare Tracer der lymphatische Transport die überwiegende Abflussroute für CSF aus dem Subarachnoidalraum ist, und nicht die bisher allgemein anerkannte Route durch die arachnoiden Granulationen. Zusätzlich wiesen wir verringerten Lymphabfluss des CSF in alten im Vergleich zu jungen Mäusen nach, was andeutet, dass das Lymphsystem einen neuen therapeutischen Angriffspunkt für altersassoziierte neurologische Krankheiten darstellen könnte.

Das Glioblastom ist ein bösartiger Hirntumor mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit der Patienten von weniger als 15 Monaten. Das damit verbundene Hirnödeme führt zu intrakranialer Hypertonie, welche bei Glioblastompatienten zu starken Kopfschmerzen und einer starken Verminderung der Lebensqualität führt. Um potenzielle therapeutische Strategien zu finden, ist es erforderlich, die Veränderungen im Flüssigkeitsausfluss aus dem zentralen Nervensystem im Glioblastom zu beurteilen. Im dritten Projekt quantifizierten wir den Transport der Tracer in das Blut und in die Hirn-drainierenden Lymphknoten nach Infusion in einen Seitenventrikel oder in das Hirnparenchym, und stellten fest, dass der Flüssigkeitsausfluss aus dem zentralen Nervensystem in Glioblastom-tragenden Mäusen stark reduziert war. Die paravaskulären Wege waren beeinträchtigt, und die Expression des Wasserkanalproteins Aquaporin 4 war in der Tumormasse nicht nachweisbar, während seine polarisierte Expression in der Tumorperipherie gestört war. Behandlung mit Dexamethason, das häufig zur Reduzierung von Hirnödemen angewendet wird, verbesserte den Flüssigkeitsausfluss aus dem zentralen Nervensystem. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein beeinträchtigter Flüssigkeitsausfluss eng mit dem Hirnödeme verwandt ist, und dass therapeutische Massnahmen zur Verbesserung des Flüssigkeitsausflusses die Komplikationen bei Glioblastompatienten mindern könnten.

Insgesamt haben wir eine wichtige Rolle der Lymphgefäße in der Fernmetastasierung und im Flüssigkeitsausfluss aus dem zentralen Nervensystem unter physiologischen Bedingungen sowie im Alter und bei Glioblastomerkrankung identifiziert. Somit könnten therapeutische Ansätze, die auf die Lymphgefäße zielen, vorteilhaft für Patienten mit metastatischem Krebs und mit neurologischen Störungen sein.