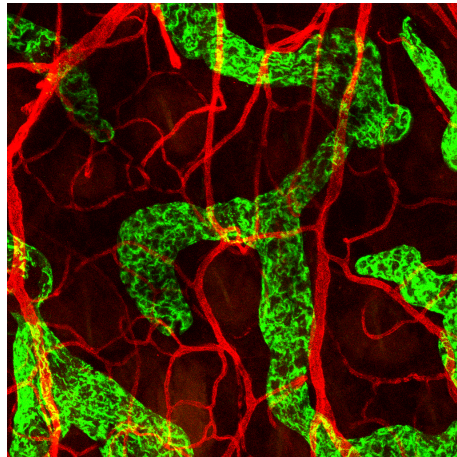


DISS. ETH NO. 24994

**The role of IL-7 receptor alpha signaling in vascular biology  
and skin inflammation: Elucidating the functional and  
therapeutic implications**



A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**MARTINA VRANOVA**

**2018**

DISS. ETH NO. 24994

**The role of IL-7 receptor alpha signaling in vascular biology and skin inflammation: Elucidating the functional and therapeutic implications**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

**Martina Vranova**

MSc ETH in

Medicinal and Industrial Pharmaceutical Sciences

ETH Zurich, Switzerland

Born on 11.06.1989

Citizen of Belgium and Slovakia

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter

Prof. Dr. Michael Detmar

2018

# 1. Summary

## 1.1 Summary

The lymphatic and blood vasculature act in concert to maintain tissue fluid homeostasis and immune surveillance. During inflammation the activated endothelium of blood vessels (BVs) becomes more permeable and recruits inflammatory cells and mediators to the tissue. Lymphatic vessels (LVs) drain extravasated tissue fluids and immune mediators, but also play a role in immune activation by regulating immune cell trafficking to the draining lymph nodes (dLNs). The vasculature undergoes profound remodeling and it has become clear that LVs and BVs are important modulators of the inflammatory response. Recent studies have shown that stimulating lymphangiogenesis and lymphatic drainage ameliorates certain chronic inflammatory diseases by stimulating the removal of fluids and inflammatory mediators from the inflamed tissues.

Our group has recently identified the interleukin-7 (IL-7) receptor  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) signaling pathway as a new modulator of lymphatic function (Iolyeva et al., 2013a). Lymphatic drainage was impaired in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice, while drainage was increased in IL-7 transgenic (IL-7tg) mice, which overexpress IL-7 in all cells, or in mice treated for just one week with IL-7. The IL-7R $\alpha$ -mediated changes in lymphatic drainage depended on the receptor expression in stromal cells rather than in hematopoietic cells. Furthermore, the morphology of the LV network was altered in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> and IL-7tg mice. IL-7 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP), the ligands of IL-7R $\alpha$ , have been primarily studied for their roles in leukocyte function. IL-7 is known for its role in B and T cell development, LN organogenesis, and homeostasis of naive and memory T cells. In recent years IL-7 has also been described as an immunostimulatory cytokine with a role in chronic inflammatory autoimmune diseases. TSLP also plays a role in T and B cell development and is known for stimulating allergic diseases.

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease. Recent studies have shown that stimulating lymphatic drainage in psoriasis-like inflammation in mice ameliorates symptoms. IL-7 and TSLP are upregulated in human psoriasis, but their role in psoriasis has not been elucidated. In this thesis, we therefore investigated how the

protective drainage-enhancing effect and the potentially damaging immunostimulating role of IL-7R $\alpha$  signaling would affect the progression of psoriasis-like skin inflammation in two animal models. IL-7 treatment exacerbated inflammatory cell infiltration and edema in spite of increased lymphatic drainage, whereas treatment with an anti-IL-7R $\alpha$  antibody ameliorated inflammatory symptoms. IL-7R $\alpha$ <sup>ΔEC</sup> mice, which have an endothelial-specific deletion of the IL-7R $\alpha$ , developed more edema compared to control mice in response to two different inflammatory stimuli, illustrating the importance of lymphatic drainage for the resolution of skin inflammation. Overall our data reveal that the immunostimulatory effects of IL-7R $\alpha$  signaling overrode the protective drainage-enhancing effects in skin inflammation and identify this pathway as a possible therapeutic target in psoriasis.

In a second project, we investigated the mechanism by which IL-7R $\alpha$  signaling affects lymphatic drainage by assessing the function of the LV machinery in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> and IL-7 treated mice. Surprisingly, lymphatic contractility of the lymphatic muscle cells (LMCs), which propel lymph through phasic contractions, was increased in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> compared to wild type (WT) mice, despite the impaired lymphatic drainage seen in these mice. Furthermore, we observed more backflow and leakage of the injected dye in lymphatic collectors of IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> compared to WT mice. Conversely, IL-7 treatment did not alter lymphatic pumping, suggesting that the increased contractility seen in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice might be a compensatory mechanism for another defect. However, no significant changes that could explain this phenotype were found in the LMC coverage of lymphatic collectors, the organization of the junctions in initial lymphatic capillaries, which could affect permeability, or the distribution and appearance of the valves, which prevent backflow. Interestingly, the BV morphology was affected in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> compared to WT mice. Blood vascular leakage was decreased in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> compared to WT mice, while IL-7 treatment did not impact blood vascular leakage. These data support the idea that reduced lymphatic drainage may be linked to reduced blood vascular leakage and that one results in the other. Further studies are needed to elucidate the exact role of IL-7R $\alpha$  signaling in blood and lymphatic vascular function and morphology. These studies will facilitate the development of targeted therapies that improve lymphatic function.

## 1.2 Zusammenfassung

Das lymphatische und das Blutgefäßsystem wirken zusammen zur Aufrechterhaltung der Homöostase der Körperflüssigkeiten und zur immunologischen Überwachung in den Geweben. Während Entzündungsprozessen steigt die Permeabilität des aktivierten Blutendotheliums und Immunzellen werden durch das aktivierte Blutendothelium chemotaktisch angezogen. Lymphatische Gefäße transportieren die Gewebeflüssigkeit, Immunmoleküle und -zellen ab, tragen aber auch zur Immunaktivierung bei, indem sie den Transport von Immunzellen in die Lymphknoten steuern. Sowohl lymphatische, als auch Blutgefäße werden während Entzündungsprozessen stark moduliert und bestimmen den Verlauf der Entzündung entscheidend mit. Neue Untersuchungsberichte haben gezeigt, dass bestimmte chronische Entzündungskrankheiten durch die Stimulierung der Lymphangiogenese und der Lymphdrainage geheilt werden können.

Unsere Gruppe hat kürzlich herausgefunden, dass der Interleukin-7 (IL-7) Rezeptor  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) Signalweg die Lymphdrainage steuert (Iolyeva et al., 2013a). Während die Lymphdrainage in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen gehemmt war, wurde sie sowohl in IL-7 transgenen Mäusen, die eine Überexpression von IL-7 in allen Zellen zeigen, als auch in Mäusen, die für nur eine Woche mit IL-7 behandelt wurden, verstärkt. Die durch IL-7R $\alpha$  vermittelte Veränderung der Lymphdrainage war abhängig von der Expression des Rezeptors in Stromazellen und nicht in hämatopoetischen Zellen. Ausserdem zeigten IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> und IL-7 transgene Mäuse eine veränderte Morphologie des Lymphgefäßnetzes. IL-7 und Thymus stromales Lymphopoietin (TSLP), die Liganden des IL-7R $\alpha$ , wurden bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit Leukozytenfunktionen erforscht. IL-7 ist bekannt für seine Rolle in der Entwicklung von sowohl T- und B-Lymphozyten, als auch von Lymphknoten, und für die Homöostase der naiven- und der Gedächtnis-T-zellen. In den letzten Jahren wurde ausserdem beschrieben, dass IL-7 in der Stimulierung von chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt. TSLP ist ebenfalls in die Entwicklung von T- und B-Lymphozyten und in allergische Erkrankungen involviert.

Psoriasis ist eine chronische Entzündungskrankheit der Haut. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Stimulierung der Lymphdrainage in Mausmodellen für Psoriasis die Entzündungssymptome verbesserte. Die Expression von IL-7 und TSLP ist in der Haut von Psoriasis Patienten erhöht. Trotzdem ist die Rolle von IL-7 und TSLP in Psoriasis unklar. In dieser Dissertation haben wir deshalb untersucht, wie die schützende Lymphdrainage-fördernde Wirkung und der potenziell schädliche immunstimulierende Effekt der IL-7R $\alpha$  Signalkaskade den Verlauf der Psoriasis in zwei verschiedenen Mausmodellen beeinflusst. Die Behandlung mit IL-7 hat trotz erhöhter Lymphdrainage zu einer grösseren Infiltration von Immunzellen und verschlimmertem Ödem geführt. Auf der anderen Seite hat die Behandlung mit einem IL-7R $\alpha$  blockierenden Antikörper zur Verbesserung der Entzündungssymptome geführt. IL-7R $\alpha^{\Delta EC}$  Mäuse, in welchen die Expression des IL-7R $\alpha$  spezifisch in Endothelzellen blockiert wurde, entwickelten im Vergleich zu Kontrollmäusen nach Stimulierung mit zwei verschiedenen Entzündungsreizen verstärktes Ödem. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Lymphdrainage für den Heilungsprozess in Entzündungskrankheiten ist. Dennoch ist die immunstimulierende Wirkung des IL-7R $\alpha$  Signalwegs im Vergleich zu den schützenden Lymphdrainage-fördernden Effekten vorherrschend und machen diesen damit zu einem interessanten therapeutischen Ansatzpunkt in Psoriasis.

In einem zweiten Projekt haben wir die Mechanismen, durch die der IL-7R $\alpha$  Signalweg die Lymphdrainage fördert, untersucht, indem wir die funktionellen Komponenten der lymphatischen Gefässe in IL-7R $\alpha^{-/-}$  und mit IL-7 behandelte Mäusen analysiert haben. Erstaunlicherweise konnten wir, trotz niedrigerer Lymphdrainage in IL-7R $\alpha^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen, eine erhöhte Kontraktilität der lymphatischen Muskelzellen (welche den Lymphfluss mittels phasischer Kontraktionen antreiben) feststellen. Ausserdem beobachteten wir einen erhöhten Rückfluss und Auslauf des injizierten Färbemittels aus den lymphatischen Kollektorgefässen in IL-7R $\alpha^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. Hingegen veränderte die Behandlung von Mäusen mit IL-7 die lymphatische Kontraktilität nicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die erhöhte Kontraktilität der lymphatischen Gefässe in IL-7R $\alpha^{-/-}$  Mäusen wahrscheinlich die Folge eines Ausgleichungsmechanismus für einen anderen Defekt ist. Jedoch konnten wir keinen Defekt, der diesen Phänotyp erklären könnte finden, weder in

der Muskelabdeckung der lymphatischen Kollektorgefäße, in der Organisation der Zell-Zell-Verbindungen in den lymphatischen Kapillaren (welche die Permeabilität regulieren), noch in der Organisation der lymphatischen Klappen (welche den Rückfluss von Lymphe vermeiden). Interessanterweise war die Morphologie des Blutgefäßnetzes in IL-7R $\alpha^{-/-}$  im Vergleich zu WT Mäusen verändert. Ausserdem war der Flüssigkeitsaustritt aus Blutgefäßen in IL-7R $\alpha^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen vermindert, während die Behandlung mit IL-7 den Flüssigkeitsaustritt aus Blutgefäßen nicht beeinflusste. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, dass die verringerte Lymphdrainage und der niedrigere Flüssigkeitsaustritt aus Blutgefäßen gekoppelt sein könnten und dass sie sich beidseitig beeinflussen. Zukünftige Studien werden zeigen, wie der IL-7R $\alpha$  Signalweg die Funktion und Morphologie der Gefäße genau beeinflusst. Diese Studien werden die Suche nach Molekülen, die spezifisch die Lymphdrainage fördern, unterstützen.