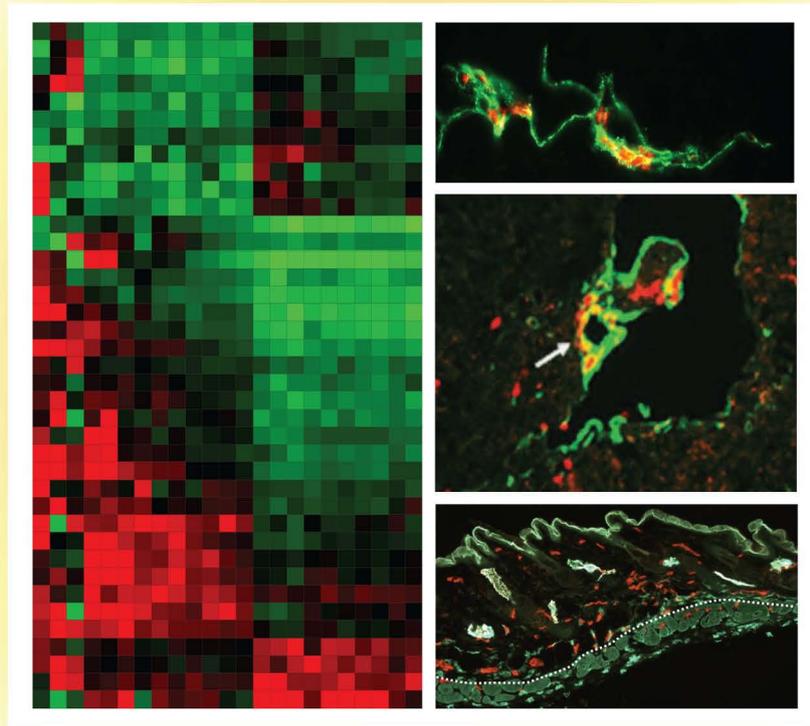


DISS. ETH NO. 17752

MOLECULAR MECHANISMS CONTROLLING LYMPHATIC VASCULAR FUNCTION



A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

JAE (JAY) WOO SHIN
April 4th, 1981

citizen of
United States of America

accepted on the recommendation of
Prof. Michael Detmar
Prof. Dario Neri

2008

1 SUMMARY

1.1 Summary

In this thesis, I describe several novel molecular mechanisms controlling lymphatic vascular function during endothelial lineage-specific differentiation and lymphangiogenesis.

The essential functions of the lymphatic vascular system include the maintenance of tissue fluid homeostasis and immune surveillance. Impaired function of the lymphatic system can lead to several diseases such as primary or secondary lymphedema, whereas recent evidence indicates that tumor-induced activation of lymphatic vessels promotes cancer metastasis. In the past, the lack of lymphatic-specific molecular markers has hampered progress in the field of lymphatic vascular biology. However, during the last decade, several key lymphatic-specific markers have been discovered and have been shown to be important molecular regulators during embryonic development, normal fluid balance homeostasis, the afferent immune response, acute and chronic inflammation and cancer spread. In this thesis, I have investigated novel molecular mechanisms regulating lymphatic vascular function, based on the identification of novel lymphatic-specific markers by oligonucleotide microarrays of cultured lymphatic endothelial cells, and on the functional characterization of select lymphatic-specific markers *in vitro* and *in vivo*.

In order to investigate the role of the lymphatic system during embryogenesis, we have recently overexpressed the lymphatic-specific transcription factor Prox1 in cultured blood vascular endothelial cells (BEC), isolated from human foreskin. We found that ectopic overexpression of Prox1 recapitulates, at least in part, the embryonic lymphatic reprogramming of vascular endothelium by downregulating BEC-specific genes and by up-regulating several lymphatic endothelial cell (LEC)-specific genes. In this thesis, I present evidence demonstrating that Prox1 upregulates the expression of Fibroblast Growth Receptor-3 (FGFR-3) during lymphatic reprogramming and that FGF signaling through the upregulated FGFR-3 plays an important role in the early development of the lymphatic vascular system (Chapter 3; Section 1).

Furthermore, using transcriptional profiling by gene microarray technology, I have compared the gene expression profiles of cultured human blood vascular (BEC) and lymphatic (LEC) endothelial cells. These studies have revealed a set of 236 lymphatic signature genes and 342 blood vascular signature genes, many of which have not been previously known to be expressed in a lineage-specific manner. Based on the identification of these signature genes, I have established a Low-Density Microvascular Differentiation Array (LD-MDA), a novel tool to quantify the degree of endothelial lineage-specific differentiation of various endothelial cell types *in vitro* which has also allowed the identification of novel (lymph)angiogenesis factors involved in the chronic inflammatory skin disease psoriasis (Chapter 3; Section 2).

Based on the identification of lymphatic signature genes, I present evidence that an active form of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) is more strongly expressed in lymphatic endothelium as compared to blood vascular endothelium in several different human tissues. To investigate the functional role of DPPIV in LEC biology, I have performed cell proliferation, migration, tube formation and adhesion assays after siRNA-mediated knockdown of DPPIV. These studies have elucidated a dual function of DPPIV in lymphangiogenesis (Chapter 3; Section 3).

Previous studies have revealed that vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-C are upregulated in metastatic cancers, and that they are the major molecular mediators of tumor-induced lymphangiogenesis which promotes lymph node and distant cancer metastasis. Thus, the identification of downstream mediators of the effects of VEGF-A and/or VEGF-C may reveal novel targets for inhibiting lymphangiogenesis and cancer spread. In this thesis, I have performed a comprehensive gene expression profiling screen of LEC stimulated with VEGF-A or VEGF-C for different periods of time. These studies have revealed a number of novel mediators of lymphangiogenesis and, in particular, have identified endocan - also known as ESM1 - as a novel mediator of VEGF-A and of VEGF-C-induced lymphangiogenesis. I demonstrate that endocan significantly promotes LEC proliferation and migration in concert with VEGF-A and VEGF-C, and that silencing of endocan expression significantly attenuates the VEGF-A/VEGF-C induced LEC proliferation and migration *in vitro* and VEGF-A induced lymphatic vessel enlargement *in vivo* (Chapter 3; Section 4).

1.2 Zusammenfassung

In dieser Arbeit beschreibe ich mehrere neue molekulare Mechanismen, welche die Differenzierung lymphatischer Endothelzellen sowie die Lymphangiogenese kontrollieren.

Zu den essentiellen Funktionen des lymphatischen Systems gehören die Regulierung des Flüssigkeitsdrucks im Gewebe sowie die Immunüberwachung des Organismus. Eine Funktionsstörung des lymphatischen Systems kann zu einer Reihe von Krankheiten führen, zum Beispiel dem primären oder sekundären Lymphödem. Jüngste Studien weisen zudem darauf hin, dass die Krebsmetastasierung durch eine Tumor-induzierte Aktivierung lymphatischer Gefäße gefördert wird. Das Fehlen von spezifischen molekularen Markern für lymphatische Gefäße hat die Erforschung der Biologie des lymphatischen Systems lange Zeit behindert. Im vergangenen Jahrzehnt wurden jedoch mehrere entscheidende solcher Marker entdeckt, welche sich auch als wichtige molekulare Regulatoren erwiesen haben für die embryonale Entwicklung des lymphatischen Systems, die Regulierung des Gewebedrucks und die afferente Immunantwort, sowie für pathologische Situationen wie die akute und chronische Entzündung und die Ausbreitung von Krebs.

Basierend auf der Identifizierung neuer spezifischer lymphatischer Marker mittels Oligonukleotid-Microarrays kultivierter lymphatischer Endothelzellen, sowie der funktionellen Charakterisierung ausgewählter solcher Marker *in vitro* und *in vivo*, habe ich in dieser Arbeit neue molekulare Mechanismen untersucht, welche lymphovaskuläre Funktionen regulieren.

Um die Rolle des lymphatischen Systems während der Embryogenese zu untersuchen, haben wir kürzlich den Lymphendothel-spezifischen Transkriptionsfaktor Prox1 in aus menschlicher Vorhaut isolierten, kultivierten Blutgefäßendothelzellen überexprimiert. Es zeigte sich, dass die Überexpression von Prox1 zumindest teilweise die Umprogrammierung von Blutgefäß- zu Lymphendothelzellen während der embryonalen Entwicklung rekapituliert, indem sie die Expression Blutgefäßendothel-spezifischer Gene verringert und die Expression mehrerer Lymphendothel-spezifischer Gene erhöht. Meine Arbeit liefert Hinweise darauf, dass Prox1 während der lymphatischen Umprogrammierung des Blutgefäßendothels die

Expression von FGFR-3 verstärkt, und dass FGF-Signale, welche über diesen verstärkt exprimierten Rezeptor vermittelt werden, während der frühen Entwicklung des lymphatischen Systems eine wichtige Rolle spielen (Kapitel 3; Abschnitt 1).

Des Weiteren habe ich die Genexpressionsprofile kultivierter humaner Blutgefäß- und Lymphendothelzellen mittels Microarray-Technologie verglichen. Diese Untersuchungen führten zu einem Satz von 236 lymphatischen Signatur-Genen und 342 Blutgefäß-Signatur-Genen, von denen viele noch nicht als spezifisch für den einen oder anderen Endothelzelltyp bekannt waren. Basierend auf der Identifizierung dieser Signatur-Gene habe ich sogenannte „Low Density Microvascular Differentiation Assays“ (LD-MDA) entwickelt, mit deren Hilfe sich das Ausmass der lymphatischen oder blutgefäßartigen Differenzierung verschiedenster Endothelzell-Typen *in vitro* quantifizieren lässt. Diese Assays haben auch die Identifizierung neuer (lymph)angiogener Faktoren ermöglicht, welche in der chronisch entzündlichen Hautkrankheit Schuppenflechte (Psoriasis) eine Rolle spielen (Kapitel 3; Abschnitt 2).

Ebenfalls basierend auf der Identifizierung lymphatischer Signatur-Gene zeige ich, dass eine aktive Form des Enzyms Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) stärker auf lymphatischem als auf Blutgefäßendothel exprimiert wird. Um die funktionelle Bedeutung von DPPIV in lymphatischen Endothelzellen zu untersuchen, habe ich Zellproliferations-, Migrations-, Röhrenbildungs- und Adhäsions-Analysen nach Ausschaltung der DPPIV-Expression mittels siRNA durchgeführt. Diese Versuche haben eine Doppelfunktion von DPPIV in der Lymphangiogenese gezeigt (Kapitel 3; Abschnitt 3).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Wachstumsfaktoren Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) und VEGF-C in metastatischen Krebsgeschwüren hochreguliert sind und dass sie die bedeutendsten molekularen Mediatoren der Tumor-induzierten Lymphangiogenese sind, welche ihrerseits Lymphknoten- und entfernte Metastasen begünstigt. Die Identifizierung molekularer Mediatoren der Effekte von VEGF-A und/oder VEGF-C könnte daher zu neuen Zielmolekülen für die Hemmung der Lymphangiogenese und damit der Krebsausbreitung führen. In dieser Arbeit habe ich eine umfassende Untersuchung der Genexpressionsprofile lymphatischer Endothelzellen, welche während unterschiedlicher Zeiträume mit

VEGF-A oder VEGF-C stimuliert wurden, durchgeführt. Diese Studien haben eine Reihe neuer Mediatoren der Lymphangiogenese ergeben, insbesondere habe ich Endocan – auch bekannt als ESM1 – als neuen Mediator der durch VEGF-A und durch VEGF-C induzierten Lymphangiogenese identifiziert. Ich zeige, dass Endocan im Zusammenspiel mit VEGF-A und VEGF-C die Proliferation und Migration lymphatischer Endothelzellen signifikant fördert, und dass Ausschaltung der Expression von Endocan die durch VEGF-A/C induzierte Proliferation und Migration lymphatischer Endothelzellen *in vitro* sowie die durch VEGF-A induzierte Vergrößerung lymphatischer Gefäße *in vivo* signifikant abschwächt (Kapitel 3; Abschnitt 4).