

Identification of novel tumor-specific endothelial markers by using laser capture microdissection and transcriptional profiling

Doctoral Thesis

Author(s):

Nikolic, Milica

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005949504>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS.ETH.Nr. 18366

**IDENTIFICATION OF NOVEL TUMOR-SPECIFIC
ENDOTHELIAL MARKERS BY USING LASER CAPTURE
MICRODISSECTION AND TRANSCRIPTIONAL
PROFILING**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

MILICA NIKOLIC
Dipl.sci.nat.ETH
August 9th, 1979

citizen of Serbia

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

2009

1. SUMMARY

1.1 Summary

To date, targeting angiogenesis represents one of the most promising anti-cancer strategies. In the past decade, the relevance of tumor-induced lymphangiogenesis for the metastatic spread of tumor cells has been demonstrated as well, thus indicating the potential of targeting tumor lymphangiogenesis to treat cancer. Whereas numerous preclinical studies demonstrated that blocking angiogenesis or lymphangiogenesis could inhibit tumor metastasis, the scarcity of highly selective targeting candidates hampers their translation to the clinic.

In order to identify novel tumor-specific endothelial markers we employed a new approach consisting of immuno-laser capture microdissection (i-LCM) and transcriptional profiling. Specific identification of lymphatic (LECs) and blood (BECs) endothelial cells was facilitated using short immunostainings prior to microdissection. Identification of LECs was performed by utilizing antibodies against the lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1). For the identification of BECs, the MECA-32 antibodies specific for mouse blood vasculature were used. Isolation of tumor-associated and normal BECs and LECs by using i-LCM allowed new insights into the *in vivo* processes occurring between endothelial and tumor cells.

For the subsequent comparative gene expression profiling, two strategies were employed. The first strategy consisted of 2 rounds of 3'-based linear amplification followed by microarray analysis with the Applied Biosystems microarray platform. The second strategy included a single round of the newly developed Ribo-Spia amplification method in combination with the Affymterix microarray platform. Due to the minimal bias introduced by the Ribo-Spia amplification technique, the latter strategy led to the identification of 540 genes upregulated in tumor-associated LECs, instead of the 68 genes previously identified with the Applied Biosystems platform.

Comparison of obtained gene expression profiles of tumor-associated and normal BECs and LECs led to the identification of differentially expressed genes in tumor-associated

vasculature. Interestingly, LYVE-1 was also identified to be upregulated in tumor-associated LECs. Microarray findings were substantiated by real-time PCR and immunostaining, which showed that LYVE-1 was upregulated on the protein level in addition to the transcript upregulation. Thus, this study for the first time showed evidence for LYVE-1 upregulation in tumor-associated LECs. Another newly identified upregulated gene in tumor-associated LECs and BECs was the axon guidance receptor neogenin. Immunostainings have demonstrated not only that neogenin protein is upregulated in tumor-associated LECs and BECs, but also that this upregulation was tumor-specific and did not occur in inflammation-associated activation of lymphatic vessels. Neogenin therefore might represent a promising candidate for tumor targeting. Furthermore, the upregulation of neogenin in lymphatic vessels of lymph nodes in the tumor vicinity offers the possibility of using neogenin as a prognostic indicator for the metastatic spread of tumor cells.

In summary, this study demonstrates the potential of i-LCM for the characterization of cell-type specific gene expression changes within highly heterogeneous samples, such as tumors. By using i-LCM combined with transcriptonal profiling, several promising candidates for targeting of the tumor vasculature were identified.

1.2 Zusammenfassung

Gezielte Eingriffe in die Blutgefäßneubildung (Angiogenese) stellen heutzutage eine der vielversprechendsten Strategien zur Bekämpfung von Krebs dar. Der schädliche Einfluss der Tumor-induzierten Lymphgefäßneubildung (Lymphangiogenese) auf die Überlebensprognose und die Begünstigung der Metastasierung haben in den letzten Jahren ihr Potenzial als Krebstherapieangriffspunkt demonstriert. Mehrere klinische Studien haben bereits gezeigt, dass das Blockieren der Angiogenese oder der Lymphangiogenese einen inhibitorischen Effekt auf die Tumormetastastasierung haben könnte. Dennoch behindert der Mangel an hoch selektiven Zielmolekülen für eine therapeutische Intervention weiteren Fortschritte in Richtung klinische Anwendung.

Zur Identifizierung neuer Tumor-spezifischer Endothelmarker haben wir ein neues Verfahren durch die Kombination von Immuno-Laser Capture Microdissection (i-LCM) und Genexpressionsanalyse eingesetzt. Die beschleunigte Immunfärbung vor der Microdissection erlaubte uns eine spezifische Markierung von Lymphendothelzellen (LECs) mit dem LYVE-1 Antikörper und Blutendothelzellen (BECs) mit MECA-32 Antikörpern. Die anschließende Isolation der LECs and BECs mittels i-LCM hat uns eine neue Einsicht in die stattfindenden *in vivo* Prozesse zwischen Endothel- und Tumorzellen gegeben.

Für die folgende Genexpressionanalyse wurden zwei Strategien entwickelt. Die erste Strategie umfasste zwei lineare Amplifikationzyklen und die Applied Biosystems Microarray Analyse, während die zweite Strategie nur einen neu entwickelten Ribo-Spia Amplifikationszyklus und die Affymetrix Microarray Analyse beinhaltete. Die Ribo-Spia Amplifikation und die folgende Affymetrix Microarray Analyse leitete mit 540 hochregulierten Genen in tumor-assoziierten LECs einen minimalen Verlust der Genexpressionsunterschiede ein. Verglichen mit 68 Genen, die bei der Applied Biosystems Microarray Analyse identifiziert wurden, erwies sich die Affymetrix Microarray Plattform als vorteilhaft.

Der Vergleich der Genexpressionsprofile von Tumor-assoziierten und normalen LECs and BECs führte zur Identifizierung der differentiell exprimierten Gene in den Tumorgefäßen. Die Genexpressionsresultate wurden weiter durch real-time PCR und Immunfärbungen bestätigt.

Unter den Zielmolekülkandidaten befand sich interessanterweise LYVE-1, dass neben der Transkriptionsebene auch auf Proteinebene in Tumor-assoziierten LECs hochreguliert wurde. Der neuronale Rezeptor neogenin ist ein weiteres Beispiel der hochregulierten Gene sowohl in tumor-assoziierten LECs als auch in BECs. Immunofärbungen haben gezeigt, dass neogenin nicht nur auf der Transkriptionsebene, sondern auch auf der Proteinebene in den Tumor-assoziierten Gefäßen hochreguliert wird. Außerdem stellte sich heraus, dass die Hochregulation von neogenin Tumor-spezifisch war und somit nicht während Entzündungsreaktionen stattfindet. Neogenin könnte deswegen ein potenzieller Kandidat für anti-Krebsstudien sein. Darüber hinaus wurde die Hochregulierung von neogenin auch in Lymphgefäßen der Tumor drainierenden Lymphknoten festgestellt, was auf dessen mögliche Anwendung als prognostischen Indikator für die Tumormetastasierung hinweist.

Zusammenfassend haben wir in dieser Studie das Potenzial der i-LCM Methode zur Charakterisierung von Zelltyp -spezifischen Genexpressionsunterschieden in höchst heterogenen Samples, wie Tumoren, gezeigt. Mittels i-LCM kombiniert mit Genexpressionsanalyse wurden mehrere vielversprechende Kandidatengene wie LYVE-1 und neogenin identifiziert, die als therapeutische Angriffspunkte der Tumor-assoziierten Gefäße dienen könnten.