

# Identification of novel tumor vasculature specific markers as biomarkers and therapeutic targets of bladder cancer

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Roudnicky, Filip

**Publication date:**

2014

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010188952>

**Rights / license:**

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

DISS. ETH NO. 21831

**Identification of novel tumor vasculature specific  
markers as biomarkers and therapeutic targets of  
bladder cancer**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
**Doctor of Sciences**

presented by

**FILIP ROUDNICKY**

MSc. Pharmaceutical Sciences,  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia

Born May 8, 1985

Citizen of Croatia

Accepted on the recommendation of

**Prof. Dr. Michael Detmar, examiner**

**Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner**

2014

# 1 Summary

## 1.1 Summary

Bladder cancer is one of the major cancers affecting men and women. In order for bladder cancer to progress, it needs to induce the growth of blood vasculature to acquire oxygen and nutrients. Therefore, inhibiting the growth of blood vasculature could be a promising therapeutic strategy. However, current anti-angiogenic therapy that targets VEGF-A axis has shown limited success in treating cancer. Therefore, new therapeutic targets are necessary to block angiogenesis.

Tumor-associated blood vasculature differs from vasculature in healthy tissue and therefore proteins present on tumor vasculature may serve as biomarkers or targets for antiangiogenic therapy in cancer. In order to identify novel tumor-associated vasculature markers, we performed immuno-laser capture microdissection (i-LCM) of vasculature from invasive human bladder cancers and adjacent healthy bladder tissue and performed transcriptional profiling using human exon arrays. We found a large number of transcripts to be expressed in tumor-associated blood vasculature versus the vasculature of adjacent normal bladder tissue. The endothelial cell-specific molecule endocan (ESM1) was highly expressed on tumor-associated vasculature with no expression on vasculature of healthy bladder tissue. Endocan was associated with filopodia of angiogenic endothelial tip cells in invasive bladder cancer. Endocan expression on tumor vessels correlated strongly with staging and invasiveness, predicting a shorter recurrence-free survival time in noninvasive bladder cancers. Furthermore, endocan levels were higher in plasma of patients with invasive bladder cancer than healthy individuals. Mechanistic investigations in cultured blood vascular endothelial cells and transgenic mice revealed that endocan expression was stimulated

by VEGF-A through the phosphorylation and activation of VEGFR-2, which was required to promote cell migration and tube formation by VEGF-A. These findings suggest that disrupting endocan interactions with VEGFR-2 or VEGF-A could offer a novel rational strategy to inhibit tumor angiogenesis. Furthermore, endocan might serve as a useful biomarker to monitor disease progression or the response to VEGF-A-targeting therapies in patients with bladder cancer. Besides endocan, angiopoietin-like-2 (ANGPTL2) and 5'ecto nucleotidase (NT5E, CD73) were upregulated on tumor-associated vessels and showed association of high expression with shorter progression-free survival time in patients with bladder cancer. Significantly higher levels of ANGPTL2 were detected in the plasma of patients with non-invasive and invasive bladder cancer compared to healthy volunteers. We also found upregulation of insulin receptor (INSR) on tumor-associated vasculature, and high expression correlated with shorter recurrence-free survival time of non-invasive bladder cancer patients. Our initial studies in cultured human blood vascular endothelial cells suggest that insulin receptor is upregulated by hypoxia.

Using human exon arrays for transcriptional profiling allowed us to investigate alternative splicing/transcription of transcripts. Using several bioinformatics analysis methods, we could identify the presence of several alternative transcripts of molecules known to be involved in angiogenesis. We identified a shorter TSP2 transcript (BX641023) in tumor-associated vasculature that lacks TSP-1 repeats, that are anti-angiogenic. Therefore, we believe that the short TSP2 transcript does not have anti-angiogenic properties.

Collectively, these studies have led to an improved understanding of the tumor vasculature of bladder cancer. Future studies based on these findings could potentially lead to novel therapeutic targets or biomarkers.

## 1.2 Zusammenfassung

Blasenkrebs ist eine der häufigsten Krebsarten. Um zu gedeihen und seinen Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen zu decken, ist dieser Krebs, wie jeder andere Krebs auch, darauf angewiesen, das Wachstum der Blutgefäße anzuregen (Angiogenese). Viele Therapien versuchen deshalb, diesen Prozess zu hemmen. Am häufigstens wurde bis jetzt zu diesem Zweck die VEGF-A Achse ins Visier genommen, leider aber zeigte dieser Ansatz wenig Erfolg in der Krebsbekämpfung. Um die Angiogenese effektiver hemmen zu können, ist es deshalb angezeigt, nach neuen therapeutischen Zielen zu suchen.

Blutgefäße eines Tumors unterscheiden sich von Blutgefäßen in gesunden Gewebe; diese Unterschiede können als Biomarker dienen oder neue therapeutische Ansätze ermöglichen. Um neue Tumor-assoziierte vaskuläre Marker zu finden, führten wir eine sogenannte "immuno-laser capture microdissection (i-LCM) und "transcriptional profiling" von Blutgefäßen von menschlichen Blasenkrebsen durch; als Kontrolle dienten Gefäße von normalem Blasengewebe. Wir fanden eine Vielzahl von Transkripten, die nur in den Tumor-assoziierten Gefäßen aber nicht in den normalen Gefäßen exprimiert waren. Das endothel-spezifische Molekül Endocan (ESM1) war sehr stark in den Tumor-assoziierten Gefäßen exprimiert aber nicht in den normalen Gefäßen. Wir fanden Endocan in den Filopodien von endothelialen Tip-Zellen in den Blutgefäßen im Blasenkrebsgewebe. Die Expression von Endocan korrelierte stark mit dem Staging und der Invasivität des Tumors, sowie mit der Zeitspanne bis zum Tumorrezidiv. Plasmaspiegel von Endocan waren auch in Patienten mit Blasenkrebs erhöht, verglichen mit gesunden Personen. Mechanistische Studien in kultivierten Zellen zeigten, dass die Expression von Endocan durch VEGF-A stimuliert wird, vermittelt durch die Phosphorylierung und Aktivierung von VEGFR2, der für die

Aktivierung der Zellmigration notwendig war. Diese Erkenntnisse könnten neue Ansätze bieten zur Hemmung der Tumorangiogenese. Darüberhinaus könnte Endocan auch als Tumormarker dienen zur Monitorisierung der Tumorprogression oder als Marker für das Ansprechen einer anti-angiogenen Therapie. Neben Endocan waren auch Angiopoietin-like-2 (ANGPL2) und 5' Ektonuklease (NT5E, CD73) in den Tumor-assoziierten Gefäßen hochreguliert und deren Expressionslevel korrelierte mit einer kürzeren progressionsfreien Überlebenszeit bei Patienten mit Blasenkrebs. Auch fanden sich signifikant höhere Plasmaspiegel von ANGPTL2 bei Patienten mit Blasenkrebs verglichen mit normalen Personen. Wir fanden in den Tumor-assoziierten Gefäßen ebenfalls eine höhere Expression des Insulinrezeptors (INSR), und dessen Expressionslevel korrelierte mit einem verkürzten Rezidiv-freien Überleben. Aufgrund von Studien mit kultivierten humanen Endothelzellen vermuten wir, dass die Expression des Insulinrezeptors durch Hypoxie stimuliert wird.

Durch den Einsatz von Exon Arrays war es uns auch möglich, das alternative Splicing verschiedener Transkripte zu untersuchen. So fanden wir durch den Einsatz von Bioinformatik-Analysen alternative Splice-Varianten in Gefäßen aus Tumorgewebe verglichen mit normalem Gewebe. Wir fanden beispielsweise ein verkürztes Transkript von TSP2 (BX641023) in den Tumorgefäßen; interessanterweise fehlt dem verkürzten Transkript das TSP1 Motiv (welches eine anti-angiogenische Eigenschaft aufweist). Wir vermuten daher, dass das verkürzte TSP2 Transkript keine anti-angiogene Funktion mehr hat.

Zusammenfassend haben diese Studien das Verständnis der Biologie der Tumor-assoziierten Blutgefäße beim Blasenkrebs erweitert. Weiterführende Studien könnten eventuell zu neuen therapeutischen Ansätzen und/oder Biomarkern führen.