

**MULTIMODAL IN VIVO IMAGING OF HYPOXIC SIGNALING
EVENTS IN A MOUSE TUMOR MODEL**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

STEFFI LEHMANN

Dipl. Natw. ETH

born April 19, 1981

citizen of Langnau i.E., BERN, SWITZERLAND

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Rudin, examiner

Prof. Dr. Wilhelm Krek, co-examiner

Prof. Dr. Klaas Nicolay, co-examiner

Summary

Molecular imaging allows monitoring of cellular and molecular events in intact organisms *in vivo* and has hence emerged as an important tool in preclinical, biomedical research. On one hand, molecular imaging strategies are used to identify novel biomarkers of disease with the potential to be translated into the clinics for the purpose of diagnostics. On the other, *in vivo* imaging of molecular and cellular processes in their physiological surroundings is essential for the clarification of many basic research questions.

In the presented work, we have used molecular imaging strategies to study tumor hypoxia and its downstream molecular events in a mouse tumor model. As one of the predominant microenvironmental stress factors present in solid tumors, hypoxia has been shown to directly contribute to tumor progression. It activates a family of transcription factors, hypoxia inducible factors (HIFs), which mediate the adaptation of cells to low oxygen tensions in both physiological and pathological conditions. By transcriptionally inducing genes involved in angiogenesis, cell migration, cell survival and anaerobic glycolysis, HIFs can directly drive processes important to tumorigenesis. Further supporting an important role of HIFs in cancer, these factors are not only activated in response to a decrease in oxygen tension, but also by oncogenic signaling pathways. To investigate the relationship between tumor hypoxia and the activation of the HIF system during tumor progression we established imaging readouts to follow both, hypoxia and HIF activity *in vivo*, in a mouse allograft model. Hypoxia was quantified by monitoring the distribution and the uptake of [¹⁸F]-labeled fluoromisonidazole (FMISO), a nitroimidazole derivative which is trapped in hypoxic cells. To visualize the stability and the activity of HIF, we generated reporter assays based on bioluminescence *in vivo* imaging. Hypoxic signaling events were followed over a time-window of 10 days. In our study we did not find a significant correlation between tumor hypoxia and the activation of the HIF system. This demonstrates the importance of hypoxia independent pathways in the regulation of HIF activity in cancer. Furthermore, our data may question the use of FMISO-PET in the clinics for the purpose of tumor prognosis.

SUMMARY

In a second step, we employed the hypoxia imaging readouts developed in this work to study the effects of chronically treating tumor allograft mice with dimethyloxalylglycine (DMOG). Being a potent inhibitor of prolyl hydroxylases (PHDs), the enzymes which target HIF- α subunits for proteasomal degradation under normoxic conditions, this drug is commonly used to activate the HIF system. Notably, systemic, long-term application of DMOG resulted in a decrease in tumor HIF transcriptional activity. *In vitro* cell culture experiments demonstrated that this effect was mediated by the tumor cells themselves rather than by DMOG induced changes of the microenvironment. We found that chronic treatment of cancer cells with DMOG resulted in the activation of a signaling loop acting to decrease HIF levels, via the inhibition of PHDs.

In a parallel project, we focused on the generation of a reporter system which could be flexibly combined with any kind of imaging modality typically used in the field of molecular imaging. This is of particular interest with regard to the recent development of multimodal imaging assays which combine methods displaying high spatial resolution with high sensitivity approaches. Here we evaluated the use of a glycosylphosphatidylinositol anchored avidin (avidin-GPI), an avidin moiety expressed on the extracellular cell surface, as a genetic reporter for *in vivo* imaging. Avidin can be targeted with any kind of biotinylated imaging probe. The fact that the protein is expressed on the extracellular side of the cell membrane eliminates the requirement for the probes to be cell-permeable. The feasibility of using avidin-GPI as a genetic reporter to read out on HIF transcriptional activity in live tumors was demonstrated in a fluorescence reflectance approach.

Overall this thesis describes the development of imaging assays to study hypoxic signaling events *in vivo* tumor models. The results obtained from these imaging studies provided valuable new information on the relationship between tumor hypoxia and HIF signaling in the course of tumor progression. Moreover, a novel signaling loop activated by chronic inhibition of PHDs has been identified, which acts to decrease HIF-1 levels in tumors *in vivo* and may be interesting for the development of novel therapeutic means targeting hypoxic signaling in cancer.

Zusammenfassung

Mittels molekularer Bildgebungsmethoden lassen sich molekulare und zelluläre Vorgänge in Tiermodellen *in vivo* verfolgen. So sind diese Verfahren inzwischen zu wichtigen Werkzeugen der präklinischen, biomedizinischen Forschung geworden. Einerseits wird die molekulare *in vivo* Bildgebung dazu genutzt, neue diagnostische Marker zu identifizieren, die es erlauben, Krankheiten früh zu erkennen. Andererseits können mit Hilfe solcher Experimente molekulare und zelluläre Prozesse in ihrer physiologischen Umgebung *in vivo* analysiert werden, was für viele Fragestellungen der biologischen Grundlagenforschung ein grosser Vorteil sein kann.

Während meiner Dissertationsarbeit habe ich molekulare Bildgebungsstrategien entwickelt, die es uns erlauben, Tumorphoxie und die dadurch ausgelösten, molekularen Signaltransduktionskaskaden, in der Maus zu visualisieren. Weil Tumore typischerweise schneller wachsen, als dass neue Blutgefässe zum Sauer- und Nährstofftransport gebildet werden können, sind Krebszellen oft einer reduzierten Sauerstoffkonzentration, d.h. Hypoxie ausgesetzt. Dies führt zur Aktivierung von so genannten Hypoxie Induzierbaren Faktoren (HIFs), welche die Anpassung von Zellen an das Wachstum und das Überleben unter verminderten Sauerstoffkonzentrationen regulieren. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass sowohl Hypoxie als auch HIFs die Entwicklung und den Verlauf von Krebs direkt beeinflussen können. Sowohl das Vorkommen von hypoxischen Tumorarealen als auch die Detektion von HIF in humanen Tumorbiopsien werden normalerweise mit schlechteren therapeutischen Aussichten und aggressiveren Krankheitsverläufen assoziiert. In unseren Experimenten nutzten wir nukleare sowie optische Bildgebungsmethoden, um den Zusammenhang zwischen verminderten Sauerstoffkonzentrationen und der Aktivierung des HIF Systems im Verlaufe des Tumorwachstums genauer zu untersuchen. Tumorphoxie wurde quantifiziert, indem die Verteilung und die Aufnahme von [¹⁸F]-Fluoromisonidazol (FMISO), einem Nitroimidazol Derivat, das sich spezifisch in hypoxischen Zellen anreichert, gemessen wurden. Die Aktivität von HIF hingegen bestimmten wir mit Hilfe eines Reportergens, Luciferase, dessen Expression *in vivo* mittels Biolumineszenz-Bildgebung quantifiziert werden konnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Interessanterweise fanden wir im für die Studie benutzten Tumormodell keine Korrelation zwischen Hypoxie und der Aktivierung des HIF Systems. Dies verdeutlicht, dass insbesondere im Zusammenhang von Krebs, HIF durch Hypoxie unabhängige Mechanismen reguliert werden kann.

In einem zweiten Projekt, wurden Tumormäuse chronisch mit Dimethyloxalyglycine (DMOG) behandelt, einer Substanz, welche die Enzym-Familie der Prolyhydroxylasen (PHDs) inhibiert, die unter normalen Sauerstoffbedingungen den Abbau von HIF fördern. DMOG wird sowohl in der Zellkultur als auch klinisch dazu benutzt, die HIF Aktivität zu steigern. Mittels der für HIF entwickelten Bildgebungsverfahren untersuchten wir den Effekt von chronischer DMOG Behandlung auf die durch HIF regulierte transkriptionelle Aktivität in Tumoren von Mäusen. Dabei stellten wir fest, dass die wiederholte Injektion von DMOG, entgegen der Erwartungen, zu einer Reduktion der HIF Aktivität führte. Wie sich herausstellte, ist dies in erster Linie auf Prozesse in den Tumorzellen selbst und nicht auf Effekte von DMOG auf die Tumormikroumgebung zurückzuführen. Denn in *in vitro* Experimente in Zellen zeigten, dass durch Inhibierung der PHDs ein Signalmechanismus aktiviert, der ein negatives Feedback auf HIF-1 ausübt.

Parallel zu den zwei oben beschriebenen Projekten, habe ich während meiner Doktorarbeit ein neues, für die *in vivo* Bildgebung verwendbares Reportersystem entwickelt. Dieses basiert auf dem Reporterprotein Avidin, das über eine Glykosylphosphatidylinositolgruppe in der Zellmembran verankert ist (Avidin-GPI) und somit auf der Membranaussenseite exprimiert wird. Avidin kann mit biotinylierten Liganden, die an ein Kontrastmittel gekoppelt sind, visualisiert werden. Der Vorteil von Avidin-GPI als Reporter ist, dass es in verschiedenen Bildgebungsverfahren eingesetzt werden kann. Dadurch dass das Protein extrazellulär vorhanden ist, müssen die biotinylierten Liganden auch nicht zwingend die Zellmembran passieren können und dürfen somit auch hydrophiler Natur sein. In einem *in vivo* Fluoreszenz-Bildgebungsexperiment demonstrierten wir, dass Avidin-GPI dazu benutzt werden kann, die transkriptionelle Aktivität von HIF in Maustumoren zu detektieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit Imaging-Methoden entwickelt, die es ermöglichen, die hypoxische Signaltransduktion *in vivo*, in Tumormodellen der Maus zu untersuchen. Die dadurch erzeugten Resultate lieferten wichtige Informationen zum Zusammenhang zwischen Tumorhypoxie und der Aktivierung der damit verbundenen molekularen Signale während der Tumor Entwicklung. Ausserdem identifizierten wir in unseren Experimenten einen neuen Feedback Mechanismus, der durch die chronische Inhibierung von PHD Enzymen aktiviert wird, um die zelluläre HIF-1 Konzentration zu senken. Dieser Mechanismus könnte als neuer Ansatz für die Entwicklung von Krebstherapien dienen, die darauf abzielen, die Aktivität von HIF-1 in Tumorzellen zu blockieren.