

DISS.ETH NO. 25463

# An in vivo wound healing model for the characterization of the angiogenic process and its modulation by pharmacological intervention

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Martin Karl Schneider

Dr.med., University of Tuebingen, Germany

born on 20.04.1986

citizen of  
Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Markus Rudin, examiner  
Prof. Sabine Werner, co-examiner

2018

# Summary

Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is a crucial process in tumor progression and wound healing. In both situations angiogenesis is induced under hypoxic conditions, which is the result of the imbalance between oxygen delivery and consumption. Due to similarity of the angiogenesis process in tumor progression and wound healing, it was already suggested in 1986 that “tumors are wounds that do not heal” [1]. The angiogenesis process is accompanied by a carefully orchestrated release of growth stimulators and inhibitors. Clinical tumor studies revealed that hypoxia is associated with poor outcome [2], therefore hypoxia is an urgent topic to be addressed.

With increasing tumor mass almost all tumors become hypoxic, since the vascular system within and around the tumor cannot provide every cancer cell with sufficient amounts of oxygen. In addition, the supply of nutrients is impaired, what leads to increased metabolic stress for the affected cells. The cellular response to hypoxic conditions is induced by the Hypoxia Inducible Factor (HIF). The transcription factor HIF consists out of an  $\alpha$  and  $\beta$  subunit. Under normoxic conditions the HIF- $\alpha$  subunit becomes hydroxylated by the oxygen-sensing enzymes prolyl-4-hydroxylase domain (PHD). The hydroxylation of HIF-1 $\alpha$  leads to its degradation in the proteasome 26S. Since the PHDs are oxygen sensitive, hypoxic conditions lead to their inactivation. Due to the inactivated PHDs the HIF- $\alpha$  proteins persist and dimerize with HIF- $\beta$ . The HIF-complex then enters the nucleus, binds to the Hypoxia Responsive Element (HRE) site on the DNA and induces genes involved in metastasis, cell survival, metabolism, and angiogenesis.

In 2004 the first anti-angiogenic drug, bevacizumab, for the treatment of metastatic colorectal cancer in combination with 5-fluorouracil-based chemotherapy was approved by the FDA. Bevacizumab is a monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor A (VEGF A) [3]. Since then many angiogenesis inhibitors have been approved for cancer therapy, such as sunitinib. Sunitinib malate (SU11248) is a small-molecule inhibitor of multiple receptor tyrosine

kinases (RTKs). These RTKs include vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs), Flt3 stem cell factors (c-Kit), platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs), and colony-stimulating factor-1 receptors (CM-CSFRs) [4]. In 2006 the FDA approved sunitinib for the treatment of gastro-intestinal stromal tumors (GIST) after disease progression or intolerance to imatinib mesylate, and for the treatment of advanced renal-cell carcinoma (RCC) [4, 5].

However, the clinical results of these targeted anti-angiogenic drugs did not fulfil the high expectations. The response is often limited and the disease eventually progresses. Enhanced hypoxia caused by vascular pruning, changes in the tumor microenvironment and altered metabolism in cancer cells can promote escape pathways which may lead to tumor progression. One escape strategy involves alternative angiogenic pathways. Some of the most familiar compensatory angiogenic pathways are angiopoietins (ANG), placenta growth factor (PLGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF). Better understanding of these escape mechanism and their pathways might reveal the temporal interplay of the various angiogenic pathways and help to develop improved therapeutic approaches e.g. by combining existing targeted drugs.

The objective of this thesis was to enhance our understanding of the angiogenesis process by visualizing early molecular events as well as structural - and functional endpoints of the process with high spatiotemporal resolution in a longitudinal manner in vivo. Information should be gathered on both the generation of the molecular proangiogenic stimulus by assessing hypoxia and the site of molecular and structural response, the endothelial cells. For this reason, studies have been carried out in mice expressing the  $Ca^{2+}$  indicator GCaMP2 in arterial endothelial cells. Since our group had already studied HIF-activity using bioluminescent and fluorescent reporter gene assays, which yielded valuable information during tumor progression, we optimized this system by generating a new HIF-activity reporter gene assay using the near infrared fluorescent protein (iRFP). iRFP with excitation and emission maxima at 690nm and 713nm had the

advantage that it did not require a substrate such as bioluminescent assays and exploited the near-infrared window of tissue absorption. Due to its spectral properties it can be combined with other fluorescence proteins absorbing and emitting at shorter wavelength such as GFP or the perfusion tracer Texas Red. Different tumor cell lines have been successfully transduced with the lentiviral reporter construct and upregulation of iRFP under hypoxia or hypoxia mimicking conditions (pharmacological inhibition of PHD) could be demonstrated in vitro. We then studied the longitudinal expression of iRFP in B16F10 and 4T1 cancer cells in vivo using fluorescence reflectance imaging. First in vivo two-photon microscopy studies using subcutaneously implanted tumors were unsuccessful: we could not obtain high resolution images of hypoxic cancer cells within the tumor mass probably due to high absorption. For that reason, we switched to the mouse ear as injection site. The ear offered better imaging conditions due to reduced tissue thickness and in fact high resolution images have been obtained. Yet, as tumors are rapidly growing and intrinsically heterogeneous both in space and time, it was difficult to identify areas of early angiogenesis and monitor them as a function of time. We therefore switch to a wound healing models as the angiogenic cascade in wound healing and tumor progression is very similar. The wound healing model offered the advantage that site and onset of angiogenesis were much better confined enabling analysis at microscopic resolution as a function of time. By generating a tiny incision involving epidermis and dermis of the mouse ear we could control/define the location and the trigger point of the angiogenic process. The use of a two-photon-microscope enabled us to follow up the physiological wound healing process, without the requirement of implanting a tissue window that constitutes a wound on its own and due to insertion of a foreign material (window) might lead to an immunological response and to a non-physiological healing process.

To acquire early molecular signals associated with angiogenesis process we used the Cx40-GCaMP2 mouse which is expressing the calcium indicator GCaMP2 in arterial endothelial cells (EC) under the control of the connexin40 (Cx40) promoter. In an in vivo study in Zebrafish it has

been demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  transients are associated with activated VEGF receptors [6]. Since GCaMP2 is a GFP based calcium indicator the fluorescence intensity of which being modulated by the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, GCaMP2 expressing endothelial cells were detectable based on residual fluorescence activity even in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , which allowed resolving structural images of the angiogenic sprouts at high spatial resolution.

The setup allowed monitoring the formation of vascular sprouts as a function of time following the incision. Angiogenesis occurred in a highly orchestrated manner with new sprouts always originating from the distal stump of a transected artery, growing towards the wound site. The onset of angiogenic sprouts was detected on 3 day post transection (dpt), which correlated well with previous published studies. In general, already after 6 dpt connections across the wound site were confirmed morphologically. Real-time perfusion analysis with a fluorescent tracer revealed functional connectivity across the wound at 6 dpt. Moreover, even before the functional connection across the wound was established, both proximal and distal arterial stumps were perfused either via anastomoses and/or retrograde perfusion ensuring good perfusion conditions on both sides of the wound even at an early time point (4 dpt). Approximately two thirds of the newly formed sprouts developed into functional vessels. The conclusions from the morphological assessment were supported by measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  transients: we observed significantly more  $\text{Ca}^{2+}$  transients at the distal site of the wound, predominantly in endothelial cells of the sprouts, though the overall frequency of these transients was low.

In a next step we investigated how pharmacological interventions of anti-angiogenic-drugs would interfere with angiogenesis during wound healing. Sunitinib, and AZD4547 were administered either as mono- or combination therapy. AZD4547 is an experimental drug interfering with FGF signaling, i.e. with a pathway not hit by sunitinib. The single drug treatment resulted in less angiogenic sprouts and therefore less perfused sprouts. Yet, in all cases perfusion across the

wound was established at 8dpt. Hence drug treatment delayed but did not inhibit the process. The biggest impairment on sprouts and their functionality was obtained with the combination treatment. Interestingly, pharmacological intervention did not affect the ratio of perfused versus total number of sprouts, indicating that the structure of sprouts was not affected. In all treated groups the formation of anastomoses between transected arteries and adjacent veins were affected. On the proximal side this effect was even more pronounced and longer lasting than on the distal side of the wound.

In conclusion, we have characterized a novel wound healing model for evaluating the angiogenesis process non-invasively at high spatiotemporal resolution using two-photon microscopy. The high reproducibility of the model makes it an attractive tool for investigating mechanistic aspect of angiogenesis and for assessing the efficacy of therapeutic interventions under translational physiological conditions.

# Zusammenfassung

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße ist ein entscheidender Prozess in der Wundheilung und der Tumorprogression. In beiden Fällen wird die Angiogenese unter hypoxischen Bedingungen induziert. Hypoxische Bedingungen entstehen bei einem Ungleichgewicht aus Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffverfügbarkeit. Schon 1986 wurde auf Grund der Ähnlichkeit des Angiogenese-Prozesses bei der Tumorprogression und der Wundheilung die These verbreitet, dass "Tumore Wunden sind, die nicht heilen". Der Angiogenese-Prozess geht einher mit einer sorgfältigen Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Inhibitoren. Klinische Studien haben gezeigt, dass Hypoxie mit einem negativen Outcome assoziiert ist. Aus diesem Grund ist Hypoxie ein wichtiges Gebiet, das angegangen werden muss.

Mit zunehmender Tumormasse werden fast alle Tumoren hypoxisch, da das vaskuläre System innerhalb und außerhalb des Tumors nicht genügend Sauerstoff für jede Krebszelle bereitstellen kann. Zusätzlich ist noch die Nährstoffzufuhr beeinträchtigt, was zu erhöhtem metabolischem Stress in den betreffenden Zellen führt. Die zelluläre Antwort auf hypoxische Bedingungen wird durch den Hypoxie induzierbaren Faktor (HIF) eingeleitet. Der Transkriptionsfaktor HIF besteht aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit. Unter normoxischen Bedingungen wird die HIF- $\alpha$  Untereinheit hydroxyliert durch das Sauerstoff abhängige Enzym Prolyl-4-Hydroxylase Domain (PHD). Die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  führt zu dessen Abbau im Proteasom 26S. Da PHDs Sauerstoff abhängig sind, führen hypoxische Bedingungen zu deren Inaktivierung. Auf Grund der deaktivierten PHDs bleiben die HIF- $\alpha$  Proteine erhalten und dimerisieren mit HIF- $\beta$ . Der HIF-Komplex bindet dann an die HRE Promotorregion an der DNA und induziert Gene, die eine wichtige Rolle für das Zellüberleben, die Metastasierung, den Metabolismus und die Angiogenese spielen.

Im Jahr 2004 wurde das erste Anti-Angiogenese Medikament, Bevacizumab, in Kombination mit 5-Fluorouracil basierter Chemotherapie für die Behandlung von metastasierendem Kolorektalem-

Carcinom von der amerikanischen Zulassungsbehörde genehmigt. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen den Angiogenese-Wachstumsfaktor VEGF-A. Seitdem wurden viele Angiogenese-Inhibitoren, wie z.B. Sunitinib, zur Krebsbehandlung zugelassen. Sunitinib Malat (SU11248) ist ein nieder-molekularer Inhibitor mehrerer Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). Zu diesen blockierten RTKs gehören der VEGF-Rezeptor, der PDGF-Rezeptor, der c-Kit-Rezeptor und der CM-CSFR-Rezeptor. 2006 hat die FDA Sunitinib zur Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren, bei Resistenz gegen Imatinib Mesylat oder Krankheitsprogression und zur Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom zugelassen.

Allerdings haben sich die hohen Erwartungen an die spezifischen Anti-Angiogenese-Medikamente nicht in den klinischen Ergebnissen widerspiegelt. Der Therapieerfolg ist beschränkt und der Tumor schreitet letztendlich fort. Verstärkte Hypoxie verursacht durch untergegangene Tumorgefäße Veränderungen in der Tumorumgebung, und ein veränderter Metabolismus in Krebszellen kann die Entwicklung von alternativen Signalwegen begünstigen, die wiederum zur Tumorprogression führen. Ein Resistenzmechanismus kann die Nutzung alternativer Angiogenese-Signalwege sein. Zu den bekanntesten kompensatorischen Angiogenese Wachstumsfaktoren gehören Angiopoietin (ANG), Plazenta-Wachstums-Faktor (PLGF), PDGFs und FGFs. Ein besseres Verständnis dieser Ausweich-Mechanismen und ihrer Signalwege könnte dazu beitragen die zeitlichen Interaktionen verschiedener Angiogenese-Signalwege aufzuschlüsseln. Dies würde entscheidend dazu beitragen, Therapieansätze zu verbessern - zum Beispiel durch die Kombination verschiedener spezifischer Medikamente.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es unser Verständnis über Angiogeneseprozesse zu erweitern. Dies sollte durch die Visualisierung früher molekularer Ereignisse, sowie struktureller und funktioneller Prozesse erfolgen. Die Prozesse wurden in vivo mit einer hohen mikroskopischen Auflösung über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen aufgenommen.

Informationen sollten sowohl auf der Angiogenese-Faktoren erzeugenden Seite, durch die Bewertung der Hypoxie, als auch auf der darauf reagierenden Seite der Endothelzellen, die hier zu molekularen und strukturellen Ereignissen führen, gesammelt werden. Aus diesem Grund wurde eine transgene Maus verwendet, die den Calcium Indikator GCaMP2 in arteriellen Endothelzellen exprimiert.

Unsere Gruppe untersuchte bereits die HIF-Aktivität während der Tumor-Entwicklung durch die Verwendung von Biolumineszenz und Fluoreszenz-Reporter-Genen. Wir optimierten dieses System indem, wir einen neuen HIF-Aktivitäts-Reporter erzeugten. Hierfür verwendeten wir das Infrarot Fluoreszenz Protein (iRFP). iRFP hat sein Exzitationsmaximum bei 690nm und sein Emissionsmaximum bei 713nm. Dies hat den Vorteil, dass es nicht ein zusätzliches Substrat, wie z.B. bei Biolumineszenz, benötigt und wir die positive Gewebe-Absorptions-Eigenschaften im Infrarot-Bereich ausnutzen konnten. Auf Grund seiner spektralen Eigenschaften kann es mit anderen Fluoreszenz-Proteinen, die im kürzer welligen Bereich absorbieren und emittieren, wie z.B. GFP oder dem Perfusionsmarker Texas Red, kombiniert werden. Unterschiedliche Tumor-Zelllinien wurden erfolgreich mit unserem Lentivirus-Konstrukt transduziert. Die Hochregulierung von iRFP unter hypoxischen Bedingungen oder Hypoxie simulierenden Bedingungen (pharmakologische Inhibierung von PHD) konnte in vitro aufgezeigt werden. Im nächsten Schritt analysierten wir dann in einer in vivo Langzeit-Studie die iRFP Expression in B16F10 und 4T1 Krebszellen durch Fluoreszenzreflektanz-Bildgebung. In vivo Zwei-Photonen-Mikroskopie Versuche in subkutan implantierten Tumoren waren nicht erfolgreich. Wir konnten keine hochauflösenden Aufnahmen der hypoxischen Krebszellen innerhalb des Tumors aufnehmen. Dies war wahrscheinlich der hohen Absorption geschuldet. Aus diesem Grund wählten wir das Maus-Ohr als Untersuchungsmodell. Das Maus-Ohr erlaubte die Aufnahme von hochauflösenden Bildern, auf Grund der geringeren Gewebsdicke. Da Tumore generell schnell wachsen und sehr heterogen sind, war es sehr schwierig, rechtzeitig Areale zu identifizieren, die Angiogenese-

Aktivitäten aufzeigten. Schließlich wechselten wir zu einem Wundheilungs-Modell, das sich durch ähnliche Angiogenese-Kaskaden wie bei der Tumorprogression auszeichnet. Das Wundheilungs-Modell bot den entscheidenden Vorteil, dass Ort und Zeitpunkt der Angiogenese viel besser kontrolliert werden konnten. Dies ermöglichte mikroskopische Langzeitaufnahmen.

Die Wunde wurde durch einen kleinen die Epidermis und Dermis durchtrennenden Schnitt erzeugt. Durch die Verwendung eines Zwei-Photonen-Mikroskops konnten wir den physiologischen Wundheilungsprozess verfolgen. Wir benötigten keine chirurgisch implantierten Fenster, die eine Wunde für sich darstellen und dadurch zu zusätzlichen immunologischen Reaktionen führen und deshalb zu einem nicht-physiologischen Heilungsprozess.

Um molekulare Signale zu detektieren, die mit dem Angiogenese-Prozess verbunden sind, haben wir eine Cx40-GCaMP2 Maus verwendet, welche einen Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Indikator GCaMP2 in arteriellen Endothelzellen (EC) exprimiert. In einer in vivo Studie im Zebrafisch wurde gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten in Verbindung stehen mit aktivierten VEGF Rezeptoren. Da GCaMP2 ein GFP basierter  $\text{Ca}^{2+}$  Indikator ist, dessen Fluoreszenzintensität durch  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen verändert wird, konnten die GCaMP2 exprimierenden Endothelzellen auch detektiert werden ohne erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration. Dies ermöglichte es, hochauflösende Bilder von den Angiogenese-Trieben aufzunehmen.

Das Setup ermöglichte es, die sich im Anschluss an den durchgeführten Schnitt bildenden vaskulären Triebe über die Zeit darzustellen. Der Angiogenese-Prozess lief immer sehr koordiniert ab. Die neu gebildeten Gefäß-Triebe wuchsen immer von dem distal gelegenen arteriellen Stumpf in den Wundbereich ein. Der Beginn des Angiogenese-Prozesses wurde 3 Tage nach Durchtrennen (Tnd) der Arterie festgestellt. Dies entspricht auch den Ergebnissen früher durchgeführter Studien. Generell wurden bereits 6 Tnd den Wundbereich durchlaufende Gefäßverbindungen morphologisch festgestellt. Echtzeit Perfusionmessungen mit einem Fluoreszenzmarker bestätigten die funktionellen Verbindungen im Wundbereich am 6 Tnd. Sogar

bevor funktionelle Verbindungen im Wundbereich gebildet wurden, waren sowohl der proximale, wie auch der distale arterielle Stumpf bereits am 4 Tnd gut durchblutet. Dies war hauptsächlich auf neugebildete Anastomosen mit den nächst gelegenen Venen zurückzuführen. Etwa zwei Drittel der neugebildeten Gefäß-Triebe entwickelten sich zu funktionellen Gefäßen. Die Ergebnisse der morphologischen Auswertung wurden durch die gemessenen  $Ca^{2+}$  Transienten unterstrichen: Wir konnten signifikant mehr  $Ca^{2+}$  Transienten im distalen Bereich der Wunde messen, vorwiegend in Endothelzellen der Gefäß-Triebe. Jedoch war die allgemeine Frequenz dieser Transienten sehr gering.

Im nächsten Schritt untersuchten wir, wie sich pharmakologische Interventionen von Anti-Angiogenese-Medikamenten auf die Angiogenese während der Wundheilung auswirken würden. Sunitinib und AZD4547 wurden entweder einzeln oder in Kombination verabreicht. AZD4547 ist ein präklinisches eingesetztes Medikament, welches FGF-Rezeptoren blockiert. Sunitinib hingegen blockiert hauptsächlich VEGF-Rezeptoren. Die Einzelbehandlung führte zu weniger Gefäß-Trieben und deshalb zu weniger perfundierten Gefäßen. Jedoch konnten in allen Fällen perfundierte Gefäße im Wundbereich am 8 Tnd gemessen werden. Ein Anti-Angiogenese Medikament alleine hemmte den Angiogenese-Prozess, blockiert ihn aber nicht komplett. Die größte Beeinträchtigung der Gefäß-Triebe und der Funktionalität wurde mit der Kombinations-Behandlung erreicht. Interessanterweise führte die pharmakologische Intervention nicht zu einer Veränderung des Verhältnisses perfundierter Gefäße gegenüber totaler Anzahl an Gefäß-Trieben. Dies deutet daraufhin, dass die Struktur der Gefäß-Triebe nicht verändert wurde. In allen Behandlungs-Gruppen war die Ausbildung von Anastomosen zwischen durchtrennten Arterien und benachbarten Venen betroffen. Auf der proximalen Seite war dieser Effekt sogar starker ausgeprägt und anhaltender als auf der distalen Seite der Wunde.

Zusammenfassend haben wir ein neues Wundheilungs-Modell für die Erfassung des Angiogenese-Prozesses charakterisiert. Durch die Verwendung eines Zwei-Photonen

Mikroskops konnten wir nicht-invasiv, über bis zu 8 Tnd hinweg, hochauflösende Aufnahmen erstellen. Die hohe Reproduzierbarkeit des Modells macht es zu einem attraktiven Mittel, um mechanistische Aspekte der Angiogenese zu untersuchen. Dies kann auch genutzt werden, um die Effizienz therapeutischer Interventionen unter translationalen physiologischen Bedingungen zu beurteilen.