

DISS. ETH NO. 23144

***IN VIVO MOLECULAR IMAGING OF THE IMPACT OF mTOR
INHIBITION ON HYPOXIA SIGNALING IN MOUSE TUMOR MODEL***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
MANOJ NILKANTH DESAI

*Master of Science in Molecular Biology,
University of Skövde, Sweden*

born on *03.07.1984*
citizen of India

accepted on the recommendation of

Prof. Markus Rudin, Examiner
Prof. Wilhelm Krek, co-examiner
Prof. Michael Hall, co-examiner

2015

Summary

As one of the most predominant micro-environmental stress factors and common features of solid tumors, hypoxia has been shown to play important but complex role in tumor progression from microinvasive to metastatic cancers. Hypoxia activates a family of transcription factors known as hypoxia inducible factors (HIFs), which mediate adaptive cellular responses to low oxygen tension in physiological and pathophysiological conditions. HIF activity is regulated by prolylhydroxylase domain (PHD) proteins, that hydroxylate prolyl residues of the subunit HIF1 α , marking it for proteasomal degradation via the E3 ligase complex. Under hypoxic conditions PHD is inactivated leading to HIF1 α stabilization and HIF activity. HIF may transcriptionally activate genes involved in cell proliferation, cell survival, metastasis, angiogenesis and anaerobic glycolysis thereby promoting tumorigenesis and tumor growth. High levels of HIF have been often associated with increased tumor aggressiveness, patient mortality and therapeutic resistance in several cancer types. Apart from intratumoral hypoxia, HIF can also be activated by oxygen-independent oncogenic signaling pathways e.g. PI3K/Akt/ mTOR pathway. mTOR (mammalian target of rapamycin) is a protein kinase that regulates cell growth, proliferation, survival and motility. Potential links have emerged between mTOR and HIF, though the underlying mechanism and its implications on tumor growth and relevance with regard to potential therapeutic interventions need to be better understood.

The objective of this thesis was to evaluate the contribution of the mTOR pathway to HIF signaling during cancer progression using a non-invasive longitudinal imaging approach in two cancer models, a murine mammary (4T1) and colon (C51) carcinoma. In order to define the relationship between tumor hypoxia, HIF1 α expression and mTOR activity, the impact of mTOR inhibition on HIF activity was assessed by reporter gene assays based on non-invasive fluorescence *in vivo* imaging followed by *ex vivo* immune-histological analysis. C51 and 4T1 cells were stably transfected with a mCherry construct under the control of hypoxia response element (HRE) promoter. The expression system of reporter assay was characterized using western blotting, fluorescence microscopy and *in vivo* planar fluorescence imaging. Moderate hypoxia of 2% O₂ led to stabilization of HIF1 α , yet did not affect mTOR activity as reflected by p70S6K phosphorylation in the two cell lines evaluated. p70S6K is a protein kinase activated by mTOR, playing an important role in the regulation of ribosomal protein synthesis at the level of translation. Under *in vitro* conditions, administration of

rapamycin led to a dose dependent inhibition of mTOR activity and decreased HIF1 α levels in cells pretreated with dimethylxalylglycine (DMOG), an inhibitor of prolylhydroxylase, or exposed to moderate hypoxia (2% O₂). Under *in vivo* conditions, rapamycin treatment resulted in a plateauing of the volume-normalized mCherry fluorescence signal indicating significant reduction in HIF transcriptional activity. The histological analysis displayed significant inhibition of HIF1 α level in rapamycin treated tumors, however for several regions there was a spatial disconnect between HIF1 α and mTOR activity. This demonstrates that HIF activity is also regulated by mTOR-independent pathways.

In addition to the mTOR-HIF axis, we also studied the role of PHDs in regulating mTOR activity in response to amino acid and growth factors stimulation. In HEK cells, amino acid stimulation activated mTORC1 activity, which could be blocked by inhibition of PHD using DMOG. In contrast, administration of DMOG had no effect on p70S6K phosphorylation in the case of growth factor administration (fetal calf serum). Surprisingly, none of the tested tumor cell lines including: colon carcinoma (C51, DLD-1), mammary carcinoma (4T1, EO771) and melanoma (B16F10) cells, displayed p70S6K phosphorylation reflecting mTORC1 activity following the stimulation with amino acids. This demonstrates that the extent amino acid mediated mTOR signaling varies among different cell types and appears to be of little relevance for the cancer cell lines in comparison to growth factor initiated signaling. Alternatively, the absence of amino acid mediated effects on mTOR signaling in these cell lines might be attributed to differences in kinetics.

In a parallel project, we evaluated a novel near-infrared fluorescence (NIRF) reporter system for its suitability to study molecular processes associated with hypoxia signaling. In particular, we evaluated the use of a near infrared fluorescent protein, IFP1.4 as a genetic reporter for *in vivo* imaging. IFP1.4 is engineered from a bacterial phytochrome and requires biliverdin as a co-substrate to form the fluorescent chromophore. We could demonstrate the feasibility of using IFP1.4 protein as a reporter for *in vitro* evaluation of transcriptional activity of HIFs in a live cell fluorescence imaging approach. However, for *in vivo* applications IFP1.4 was found to be of limited value due to dependence of the NIRF signal on availability of biliverdin, which appears to be limited under *in vivo* conditions. Also, the fluorescent property such as the fluorescence quantum yield was found suboptimal. In the meantime, a new generation of NIRF reporter proteins has been described such as iRFP and IFP2.0, which offer substantial advantages compared to IFP1.4 and should therefore be

evaluated for their suitability to study molecular events *in vivo*, e.g. in tumor imaging experiments.

In conclusion, this thesis describes the use of a fluorescence reporter imaging assay to study the impact of mTOR inhibition on hypoxia signaling longitudinally in mouse tumor models. Results obtained from *in vivo* imaging, *in vitro* biochemical assays and *ex vivo* histology provided valuable information on the relationship between tumor hypoxia, mTOR activity and HIF1 α expression. Today, rapamycin derived drugs such as Temsirolimus or Everolimus are used clinically for the treatment of advanced cancer types such as kidney cancer but also mammary and pancreatic cancers. In this study we have shown that inhibiting mTOR leads to the reduction of HIF activity. Yet, the detailed analysis of drug effects revealed significant heterogeneity across tumor mass. In fact there were regions displaying high levels of HIF1 α and HIF downstream readouts such as GLUT1 (Glucose transporter as a measure for anaerobic glycolysis) and CD31 (measure for angiogenesis) even in the absence of phosphorylated p70S6K as measure of mTOR signaling, indicating the importance of mTOR independent pathways leading to HIF1 α stabilization and HIF activity. Thus targeting both mTOR and HIF appears an attractive strategy for developing new anticancer therapies.

Zusammenfassung

Hypoxie, ein wichtiger Stressfaktor der Mikroumgebung und allgemeines Merkmal solider Tumoren, spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Tumoren vom mikroinvasiven zum metastasierenden Krebs. Infolge Hypoxie werden eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, sogenannte Hypoxie-induzierte Faktoren (HIFs), aktiviert, die die Anpassung von Zellen an das Wachstum und Überleben unter verminderter Sauerstoffkonzentrationen regulieren. Die HIF Aktivität wird durch die Enzym-Familie der Prolylhydroxylasen (PHDs) reguliert, die unter normalen Sauerstoffbedingungen Prolyl-Seitenketten der Untereinheit HIF1 α hydroxylieren und HIF1 α somit für den proteasomalen Abbau durch den E3 Ligase-Komplex markieren. Unter hypoxischen Bedingungen werden die PHDs abgebaut, was zur Stabilisierung von HIF1 α und Aktivität von HIF führt. HIF aktiviert Gene, die beim Wachstum und Überleben der Tumorzellen, aber auch bei der Bildung von Metastasen, Angiogenese und anaerober Glycolyse involviert sind, und fördert somit die Entstehung und das Wachstum von Tumoren. Hohe Konzentrationen von HIF werden oft mit erhöhter Aggressivität des Tumors, Sterberate von Patienten und therapeutischer Resistenz bei gewissen Krebsarten in Zusammenhang gebracht. Ausser durch Tumorphypoxie wird HIF durch sauerstoffunabhängige onkogene Signalwege aktiviert. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass der PI3K/Akt/mTOR Signalweg in die sauerstoffunabhängige Regulierung von HIF involviert ist. mTOR, das ‚mammalian target of rapamycin‘, ist ein Protein, das für das Wachstum, die Proliferation, das Überleben und die Motilität von Zellen wichtig ist. Der Mechanismus der mTOR-HIF Interaktion und seine Konsequenzen für das Wachstum des Tumors und seine Relevanz bezüglich möglichen therapeutischen Massnahmen müssen noch besser verstanden werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle des mTOR Signalweges bei der Aktivierung von HIF während der Tumorentwicklung. Dazu wurden zwei Maus-Krebszelllinien, eine Brustkrebslinie (4T1) und eine Darmkrebslinie (C51), als Tumormodelle gewählt, die mittels nichtinvasiver molekularer Bildgebung in einer Verlaufsstudie charakterisiert wurden. Um eine Beziehung zwischen Tumorphypoxie, HIF1 α Expression und mTOR Aktivität zu etablieren, wurden die Auswirkungen der Inhibierung von mTOR auf die Aktivität von HIF analysiert, indem ein fluoreszierendes Reportergen in die Zellen für eine nichtinvasive *in vivo* Fluoreszenz-Bildgebung eingeschleust wurde. Die *in vivo* Daten wurden mittels *ex vivo* immunhistologischer Analyse validiert. Die Zelllinien 4T1 und C51 wurden stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das die Gen-Sequenz für das rot-fluoreszierenden

Protein mCherry enthält, dessen Expression durch einen Promotor mit „hypoxia response element“ (HRE) Motiven reguliert wird. Analysiert wurden die Expressionen der Reportergene mittels Western Blot, Fluoreszenz-Mikroskopie und *in vivo* Fluoreszenz-Bildgebung. Inhibition von PHD mittels einer Hypoxie von 2% O₂ Konzentration oder durch die Beigabe des PHD Hemmers Dimethyloxallylglyzin (DMOG) führte zur Stabilisierung von HIF1 α und damit zur Erhöhung der HIF1 α Konzentration. Dabei wurde die Aktivität von mTOR, d.h. die Phosphorylierung von p70S6K, in beiden Zelllinien nicht beeinflusst. p70S6K ist ein Protein, das bei der Translation vom Gen zum Protein eine wesentliche Rolle spielt und von mTOR phosphoryliert, d.h. aktiviert wird. Wird diesen Zellen zusätzlich Rapamycin, ein Hemmer von mTOR, zugegeben, wird eine dosisabhängige Inhibition von mTOR Aktivität und der HIF1 α Konzentration beobachtet. Bei *in vivo* Experimenten in Mäusen resultierte die Behandlung mit Rapamycin in einer signifikanten Reduktion des Tumorumfanges und auch der Aktivität der HIF Transkription, was durch das fluoreszierende Signal von mCherry, normalisiert zum Tumorumfang, angezeigt wird. Die histologische Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der HIF1 α Konzentration in Tumoren, die mit Rapamycin vorbehandelt wurden. Interessanterweise wurde eine Diskrepanz in der räumlichen Verteilung von HIF1 α und phosphoryliertem p70S6K, als Maß für mTOR Aktivität, gefunden. Dies weist auf die Regulierung der HIF Aktivität durch mTOR-unabhängige Signalwege hin.

Zusätzlich zur mTOR-HIF-Achse untersuchten wir die Rolle der PHDs bezüglich der Regulierung der mTOR Aktivität infolge Stimulation durch Aminosäuren und Wachstumsfaktoren. In humanen embryonalen Nierenzellen (HEK Zellen) führte die Stimulation durch Aminosäuren zur Aktivität des mTOR Komplexes mTORC1, die durch PHD Hemmung (Beigabe von DMOG) blockiert wurde. Im Gegensatz dazu hatte DMOG keinen Effekt auf die Phosphorylierung von p70S6K, wenn Wachstumsfaktoren aus fötalem Kälberserum (FCS) beigegeben wurden. Überraschenderweise zeigte keine der getesteten Zelllinien, d.h. Darmkrebszellen (C51, DLD-1), Brustkrebszellen (4T1, E0771) und Melanom Zellen (B16F10), eine Phosphorylierung von p70S6K nach der Stimulation durch Aminosäuren. Dies zeigt, dass das Maß der mTOR Aktivität infolge Aminosäuren Stimulation vom Zelltyp abhängt. Es drängt sich der Schluss auf, dass in Krebszelllinien die Stimulation der mTOR Aktivität durch Aminosäuren unbedeutend ist, verglichen mit jener durch Wachstumsfaktoren. Andererseits gilt es zu berücksichtigen, dass das Unvermögen von

Aminosäuren in diesen Zelllinien mTOR zu stimulieren auf einen kinetischen Effekt, d.h. auf Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit, zurückgeführt werden könnte.

Parallel zu den bereits beschriebenen Projekten untersuchten wir ein neuartiges Nahinfrarot Fluoreszenz (NIRF) Reportersystem auf seine Eignung, molekularbiologische Prozesse verbunden mit Hypoxie-Signalgebung darzustellen. Dazu benutzten wir das Nahinfrarot fluoreszierende Protein IFP1.4 als genetisch-kodierten Reporter für *in vivo* Bildgebung. IFP1.4 wurde aus einem bakteriellen Phytochrom entwickelt und benötigt Biliverdin als Co-Substrat, um das fluoreszierende Chromophor zu bilden. IFP1.4 Protein konnte als Reporterkonstrukt in Tumorzellen eingeschleust werden, wo es für die *in vitro* Evaluation der transkriptionalen Aktivität von HIF in lebenden Zellen mittels der Fluoreszenz-Bildgebung dargestellt wurde. Allerdings erscheint IFP1.4 für *in vivo* Experimenten als wenig geeignet, da die Verfügbarkeit von Biliverdin *in vivo* beschränkt ist, zumindest in dem verwendeten Tumormodell. Zudem erscheint die Fluoreszenz-Ausbeute („quantum yield“) als suboptimal. In der Zwischenzeit wurde eine neue Generation von NIRF Reporter Proteinen, wie iRFP und IFP2.0, beschrieben, welche wesentliche Vorteile gegenüber IFP1.4 zeigen. Diese sollten auf ihre Eignung getestet werden, molekulare Prozesse *in vivo*, zum Beispiel Bildgebung von Tumoren, darzustellen.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit den Einsatz von Reportern-Proteinen in der Fluoreszenz-Bildgebung, um die Interaktion von mTOR und Hypoxie Signal-Transduktion in Tumor Modellen in der Maus nichtinvasiv zu untersuchen. Die Resultate, die durch *in vivo* Bildgebung, *in vitro* biochemische Experimente und *ex vivo* histologische Analysen erhalten wurden, liefern wertvolle Informationen über die Beziehung zwischen Tumorphypoxie, mTOR Aktivität und HIF1 α Expression. Heute werden mTOR Hemmer wie Temsirolimus oder Everolimus, die von Rapamycin hergeleitet wurden, klinisch bei der Behandlung von fortgeschrittenen Krebstypen wie Nierenkrebs, Brustkrebs oder Bauchspeicheldrüsenkrebs eingesetzt. In dieser Studie haben wir gezeigt, dass die Hemmung von mTOR zu einer reduzierten HIF Aktivität führt. Jedoch zeigen die Tumore beträchtliche Heterogenität. Während es Regionen gab, in denen mTOR und HIF Aktivität in hohem Masse korrelierten, gab es auch Bereiche im Tumor, die hohe Konzentrationen von HIF1 α und HIF Zielstrukturen wie GLUT1 (Glukosetransporter, als Mass für die anaerobe Glykolyse) oder CD31 (als Mass für die Angiogenese), aber nur geringe oder nicht-detektierbare Konzentrationen von phosphoryliertem p70S6K aufwiesen. Dies deutet auf die Bedeutung von mTOR

unabhängigen Mechanismen hin, die zu einer HIF1 α Stabilisierung und HIF Aktivität führen. Es sollte daher eine attraktive Strategie für eine Krebstherapie sein, mTOR Hemmung mit HIF Hemmung zu kombinieren.