



Doctoral Thesis

## **Molecular modulators of resistance to anti-angiogenic tumor therapy and of lymphangiogenesis**

**Author(s):**

Klein, Sarah

**Publication Date:**

2013

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010003045> →

**Rights / License:**

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21449

**Molecular modulators of resistance to anti-angiogenic tumor  
therapy and of lymphangiogenesis**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**SARAH KLEIN**

MRes Biomedical Research, Imperial College London, Great-Britain

Born August 22, 1985

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

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

**Prof. Dr. Cornelia Halin Winter, co-examiner**

**2013**

# 1 Summary

## 1.1 Summary

Tumor growth depends on the delivery of oxygen and nutrients via the blood vasculature and tumors often use the lymphatic system to metastasize. Tumors can induce the growth of blood and lymphatic vessels, angiogenesis and lymphangiogenesis, by secreting vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and VEGF-C, respectively. Modulating these processes is of great interest to inhibit tumor growth and spread. Angiogenesis inhibition has been approved for the clinical treatment of cancer patients. However, the patients response is often at best transitory and the progression-free survival is only extended up to a few months - before tumors become resistant. Thus, there is an urgent need to understand the molecular changes upon anti-angiogenic therapy in more detail, in order to identify novel targets, which could be used in combinatorial therapies to improve the therapeutic outcome. Lymphangiogenesis is induced by the activation of VEGFR-3 by VEGF-C. However, the transcriptional events downstream of VEGFR-3 are largely unknown. Thus, a detailed understanding of this specific pathway might reveal new molecules that could be used to target the lymphatic system in these pathological conditions and to inhibit metastatic spread.

In the first project, we aimed at identifying potential mediators of resistance to anti-angiogenic therapy at the level of the endothelial cells. To this end, mice bearing B16-F10 melanomas were treated i.p. for 24 h with 60 mg/kg of the VEGF receptor kinase inhibitor sunitinib or vehicle control. Blood vascular endothelial cells were isolated from these tumors by fluorescence-activated cell sorting, identified as CD45-/CD31+/podoplanin- cells. Of these cells, gene microarray analyses were performed to evaluate the gene expression changes. Importantly, expression of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor c-Met was

4.8-fold increased in BECs at the mRNA level after treatment. A combinatorial treatment with sunitinib and a c-Met inhibitor reduced the tumor growth slightly more potently compared to single treatments. Using newly developed tracers and techniques for non-invasive *in vivo* quantification of vascular permeability, we found a decrease of vascular leakage in tumors already 24 h after a single sunitinib application. Additionally, reduced vascular leakage was also observed in healthy skin of sunitinib-treated mice, indicating that measurement of skin vascular permeability might serve as a new indicator for the anti-angiogenic response.

In the second project, we aimed to identify transcriptional networks that mediate the VEGF-C effects on lymphatic endothelium via VEGFR-3, utilizing a mutant form of the VEGF-C protein, named VEGF-C156S, which specifically activates VEGFR-3 but not VEGFR-2. We treated human lymphatic endothelial cells (LEC) with VEGF-C156S and obtained mRNA at 16 time points (0 min to 8 h), followed by cap analysis of gene expression (CAGE) sequencing. We identified immediate early response transcription factors (TF) whose transcripts were up-regulated in human lymphatic endothelial cells (LEC) within the first 30 to 80 min after VEGFR-3 activation by VEGF-C156S. The homeobox TF HOXD10 was found to be specifically and rapidly activated in VEGF-C156S-stimulated LECs, based on data set specificity analysis and TF activity analysis. Adenoviral gain- and loss-of-function studies revealed that HOXD10 regulated the expression of the TFs ATF3, FOSB and NR4A1, and was required for the up-regulation of NR4A1 by VEGF-C156S. Over-expression of HOXD10 led to up-regulation of eNOS expression and increased permeability of LEC monolayers. Additionally, HOXD10 gain-of-function led to enhanced proliferation and migration of LECs, whereas sprouting in a 3D collagen matrix was increased upon depletion of HOXD10. These results reveal for the first time that HOXD10 plays an important role in several aspects of lymphangiogenesis.

## 1.2 Zusammenfassung

Das Wachstum von Tumoren ist in hohem Masse von ausreichender Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff abhängig. Diese werden primär über das körpereigene Blutgefäßsystem geliefert. Zusätzlich nutzen Tumorzellen das lymphatische System zur Metastasierung. Das Wachstum von Blutgefäßen und lymphatischen Gefäßen, Angiogenese und Lymphangiogenese, zum und im Tumor wird durch die vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF-A bzw. VEGF-C vermittelt. Das Wachstum dieser zwei Systeme zu blockieren ist von hohem Interesse um einerseits das Tumorstadium zu inhibieren aber gleichzeitig auch dessen Metastasierung zu verhindern. Die Inhibierung der Tumor-induzierten Angiogenese ist heute eine zugelassene Krebstherapie. Die Wirksamkeit der Medikamente ist jedoch typischerweise nur von kurzer Dauer und das progressionsfreie Überleben wird nur wenige Monate verlängert, da es in kurzer Zeit zu einer Resistenzbildung kommt. Daher ist es von Wichtigkeit, die molekularen Veränderungen während der anti-angiogenen Therapie besser zu verstehen und neue Ziel-Moleküle für eine Kombinationstherapie zu identifizieren. Das VEGF-C/VEGF Rezeptor 3 (VEGFR-3) System stellt den wichtigsten Signalweg während der Lymphangiogenese dar. Die Aktivierung und Phosphorylierung von VEGFR-3 wurde schon im Detail untersucht, jedoch sind die direkten transkriptionellen Veränderungen nach der VEGFR-3 Aktivierung noch weitgehend unbekannt. Durch eine bessere Charakterisierung dieser Prozesse könnten neue Ziel-Moleküle für eine Anti-Lymphangiogenesetherapie identifiziert werden.

Im ersten Projekt sollten potentielle Resistenzfaktoren gegen anti-angiogene Medikamente in den Endothelzellen Tumor-assoziiertes Blutgefäße identifiziert werden. Dafür wurden Mäuse, die B16-F10 Tumore trugen, einmalig mit Sunitinib (60 mg/kg, intraperitoneal) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 24 h wurden die Blutendothelzellen mit Hilfe von

fluoreszenz-aktivierten Zell Sortierungen (FACS) isoliert, wobei die Endothelzellpopulationen als CD45-/CD31+/podoplanin- identifiziert wurden. Die RNA Extrakte dieser Zellen wurden auf Veränderungen auf dem Genexpressionslevel mittels Microarrays untersucht. Besonders interessant war hierbei die 4,8-fache Überexprimierung des c-Met Rezeptors in Sunitinib behandelten Blutendothelzellen. Eine Kombinationsbehandlung mit einem c-Met-Inhibitor und Sunitinib konnte das Tumorwachstum gegenüber einer Einzelbehandlung leicht reduzieren. Um Veränderungen in der vaskulären Permeabilität in Sunitinib-behandelten Tumoren zu analysieren, wurde eine neue nicht-invasive bildgebende Methode mit Tracern im Nahinfrarotbereich angewendet. Nach 24 h Sunitinib Behandlung war die Permeabilität reduziert. Zusätzlich war auch eine Reduzierung der Gefäßpermeabilität in der normalen Haut von Sunitinib behandelten Tieren zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass man die Permeabilität in der Haut potentiell als Indikator für den Erfolg der anti-angiogenen Therapie verwendet werden könnte.

Im zweiten Projekt sollten die transkriptionellen Veränderung nach der Aktivierung von VEGFR-3 durch VEGF-C detailliert analysiert werden. Dafür wurden humane lymphatische Endothelzellen an 16 Zeitpunkten nach Behandlung mit einer mutierten Form des VEGF-C, VEGF-C156S, welches nur an den VEGFR-3 bindet und nicht an VEGFR-2, untersucht. Mithilfe der RNA-Sequenzierungstechnologie CAGE (cap analysis of gene expression) konnten siebzehn Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die 30 min bis 80 min nach der VEGFR-3 Aktivierung in lymphatischen Endothelzellen hochreguliert wurden. Durch Vergleiche mit publizierten Datensätzen und einer Analyse der Expression von potentiellen Zielgenen haben wir herausgefunden, dass die Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors HOXD10 spezifisch in lymphatischen Endothelzellen durch VEGF-C156S Stimulation induziert werden. Mit Adenoviren wurde HOXD10 in lymphatischen

Endothelzellen überexprimiert bzw. herunterreguliert. In diesen Versuchen konnten die Transkriptionsfaktoren ATF3, FOSB und NR4A1 als Zielgene von HOXD10 identifiziert werden. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass HOXD10 für die VEGF-C156S induzierte NR4A1 Induktion notwendig ist. In HOXD10 überexprimierenden Zellen konnte eine erhöhte Expression von eNOS und eine erhöhte Permeabilität in lymphatischen Endothelzell-Monolayern festgestellt werden. Ausserdem führte HOXD10-Überexpression zu einer erhöhten Proliferation und Migration der Zellen. Andererseits führte der Knock-down von HOXD10 in lymphatischen Endothelzellen *in vitro* zu einer leicht erhöhten Aussprossung. Zusammenfassend wurde in dieser Studie zum ersten Mal eine wichtige Rolle von HOXD10 in mehreren spezifischen Aspekten der Lymphangiogenese identifiziert.