

DISS. ETH NO. 22204

***IN VIVO IMAGING OF HYPOXIA SIGNALING PATHWAY
IN A GLIOBLASTOMA MOUSE MODEL***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SANDRA BÜRGI MONTEMAYOR TREVIÑO

Master of Science UZH in Biologie Humanbiologie,

Universität Zürich

born on 04.04.1983

citizen of Gachnang, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Rudin, examiner

Prof. Dr. Michael Weller, co-examiner

Prof. Dr. Wilhelm Krek, co-examiner

2014

Summary

Glioblastomas are one of the most common primary brain tumors in adults. Statistically patients find themselves with a median life expectation of 12 to 15 months after diagnosis, even with standard treatment which consists of tumor surgical resection, radio- and chemotherapy. Two of the main hallmarks of glioblastomas are diffuse infiltrative growth and the formation of necrotic and hypoxic regions within the tumor mass. Intratumoral hypoxia is a common phenomenon of tumors and has been shown to be associated with tumor growth and its resistance to radio- and chemotherapy. This resistance originates in the decreased blood supply to hypoxic regions, which results in reduced delivery of the chemotherapeutic agents and oxygen, both of which are required for efficient therapy. It is therefore of high interest to enhance the understanding of hypoxia triggered processes, in particular signaling induced by the nuclear transcription factor HIF (hypoxia inducible factor).

The objective of this thesis was to investigate the HIF pathway regulation in relation to the tumor growth in glioblastomas using a non-invasive longitudinal imaging approach. HIF activity was assessed by means of a reporter gene assay using the bioluminescent enzyme firefly luciferase (Luc). Three glioblastoma tumor cell lines (LN229, U87, and GL261) were stably transfected with a Luc construct under the control of a promoter comprising a hypoxia response element (HRE), which is induced in the presence of HIF. A constitutively expressed SV40-Luc construct was used as control. Luc oxidizes its substrate D-luciferin and thereby generates a bioluminescent signal. The *in vitro* bioluminescence evaluation showed an induction of the bioluminescent signal in HRE-Luc transfected cells upon mimicking hypoxic settings as compared to normoxia. In contrast, the bioluminescent signal was not different for the two conditions in SV40-luc transfected control cells. An *in vitro* proliferation assay was performed to test the growth behavior of the transfected cells in comparison to the native cells. No difference in proliferation was observed for LN229 cells, while there was a difference for U87 and GL261 cells.

To evaluate hypoxia signaling under *in vivo* conditions, studies were performed for all three cell lines with tumor cells injected subcutaneously into the flank of nude mice. Tumor volume and the emitted bioluminescent signal were monitored at regular intervals during cancer growth. While LN229 and U87 tumors developed measurable tumor masses *in vivo*, GL261 tumors showed a robust growth behavior. The normalized

bioluminescence signal of GL261/HRE-Luc tumors indicated a significant transient induction of the reporter enzyme with a maximum at day 14 after implantation followed by a signal decrease toward the end of the experiment. In contrast, the control tumor GL261/SV40-Luc showed a stable bioluminescent signal output throughout the course of the experiment. This suggests a transient induction of the HIF signaling during tumor development. In comparison to the subcutaneous tumors, GL261 tumors orthotopically implanted into the mouse striatum showed a weaker induction of the GL261/HRE-Luc construct indicative of a lesser degree of hypoxia.

Histological *ex vivo* analysis of the isolated tumor tissue revealed large hypoxic as well as necrotic areas in subcutaneous GL261 tumors and only weak patchy hypoxic areas in 50% of the analyzed orthotopic tumors. The observed transient bioluminescence signal induction in subcutaneous GL261/HRE-Luc tumors decreasing toward the end of the experiment despite persistent high levels of hypoxia might be explained either by a HIF induced feedback mechanism or by the effect of the increasing necrosis toward the end of the experiment. The histological analysis of the HIF downstream products demonstrated that GLUT1 and CA9 were largely colocalized in hypoxic regions in subcutaneous tumors whereas in orthotopic tumors they were expressed in non-hypoxic tumor areas as well, suggesting that non-hypoxia dependent factors might contribute to HIF regulation in orthotopic brain tumors. For example processes reducing the availability of cofactors required for proteasomal HIF degradation would induce HIF activity even under normoxic conditions.

In conclusion the studies conducted during this thesis have shown that HIF regulation during glioblastoma tumor development can be monitored in a longitudinal manner using a luciferase reporter gene readout, that HIF signaling is transiently induced in subcutaneous and to a lesser extent in orthotopic GL261 tumors, and that there are significant differences in hypoxia and hypoxia signaling between the two implantation sites. Orthotopic tumors were found to be less hypoxic, probably due to their embedding in a heavily vascularized host region, and showed evidence of non-hypoxic activation of HIF signaling. While reporter gene based imaging assays are valuable tools for experimental studies to reveal detailed insights in biological processes in living organisms, they cannot be translated into the clinics. Translatable imaging approaches would rather use exogenous probes for HIF downstream targets using reporter systems compatible with fluorescence imaging, MRI or PET. In addition to this

it would be of high interest for future studies to target the HIF pathway in relation to the tumor microenvironment and to study the tumor-host interaction thereby.

Zusammenfassung

Glioblastomen gehören zu den häufigsten primären Hirntumoren bei Erwachsenen. Nach der Diagnose haben diese Patienten eine statistische Lebenserwartung von 12 bis 15 Monaten, auch mit Therapie. Die Standardtherapie beinhaltet die chirurgische Entfernung der Tumormasse, gefolgt von Strahlen- und Chemotherapie. Zwei Hauptmerkmale von Glioblastomen sind ein diffus infiltrierendes Wachstumsverhalten und die Bildung von nekrotischen und hypoxischen Regionen im Tumorgewebe. Intratumorale Hypoxie ist ein ausgeprägtes Phänomen bei Tumoren und es wurde gezeigt, dass es mit der Tumorentwicklung und der Resistenz zu Strahlen- und Chemotherapie assoziiert ist. Diese Therapieresistenz ist zurückzuführen auf einer verminderten Durchblutung in hypoxischen Regionen, was zu einer reduzierten Lieferung von Chemotherapiemitteln und zu einem vermindertem Sauerstoffgehalt führt. Diese sind jedoch für die Effizienz der Behandlung unerlässlich. Daher besteht ein grosses Interesse, das Verständnis des Hypoxie-induzierten Prozesses in Glioblastomen zu verbessern, insbesondere den Signalweg, der durch den nukleären Faktor HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) reguliert wird.

Diese Doktorarbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Regulation des HIF Signalweges im Zusammenhang mit dem Tumorwachstumsprozess in Glioblastomen mit Hilfe eines nicht-invasiven, zeitlich verlaufenden *Imaging* Verfahrens zu untersuchen. Um die HIF Aktivität zu messen wurde ein Reporter Gene Ansatz mit dem biolumineszenten Enzym Firefly Luciferase (Luc) verwendet. Dafür wurden drei Glioblastoma Zelllinien (LN229, U87 und GL261) mit einem Luciferase Konstrukt stabil transfiziert, das unter der Kontrolle des HIF regulierten Motifes *Hypoxia response element* (HRE) aktiviert wird, und einem ständig aktiviertem SV40-Luciferase Konstrukt als Kontrolle. Luc oxidiert sein Substrate D-Luciferin und generiert dabei ein biolumineszentes Signal. Die *in vitro* Biolumineszenz Untersuchung zeigte für die HRE-Luc transfizierten Zellen einen Anstieg des Biolumineszenzsignals unter simulierten hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen. Im Gegensatz dazu war das Biolumineszenzsignal in SV40-Luc transfizierten Kontrollzellen gleichbleibend zwischen diesen beiden Bedingungen. Ein *in vitro* Proliferations-Test wurde durchgeführt um das Wachstumsverhalten der transfizierten mit den ursprünglichen Zellen zu vergleichen. Zwischen den transfizierten und untransfizierten

LN229 Zellen konnte kein Unterschied in der Proliferation gemessen werden. Ein Unterschied wurde allerdings bei den U87 und GL261 Zellen gemessen.

Um den Hypoxie Signalweg unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen wurden Experimente mit allen drei Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden die Zellen subkutan in die Flanken von Nacktmäusen injiziert. Das Tumolvolumen und das von den Tumoren abgestrahlte Biolumineszenzsignal wurde in regelmässigen Intervallen im Laufe des Tumorwachstums gemessen. Während wir bei den LN229 und U87 Tumoren *in vivo* eine messbare Tumormasse feststellen, zeigten die GL261 Tumore ein solides Wachstumsverhalten. Das normalisierte Biolumineszenzsignal der GL261/HRE-Luc Tumore zeigte einen signifikanten vorübergehenden Anstieg des Reporter Enzyms, mit einem Maximum am Tag 14 nach der Implantation. Danach folgte ein Rückgang bis zum Ende des Experimentes. Die Kontrolltumore GL261/SV40-Luc zeigten dagegen eine stabil bleibende Signalproduktion im Verlauf des Experimentes. Das deutet auf eine transiente Aktivierung des HIF Signalweges während der Tumorentwicklung hin. Bei den orthotop implantierten GL261 Tumoren in das Striatum der Maus, zeigten die GL261/HRE-Luc Tumore einen schwächeren Anstieg verglichen mit den subkutanen Tumoren, was auf ein geringeres Mass an Hypoxie hinweist.

Die histologische *ex vivo* Analyse des isolierten Tumorgewebes zeigte grosse hypoxische, als auch nekrotische Regionen in subkutanen GL261 Tumoren und nur schwache fleckenhafte hypoxische Regionen in 50% der orthotopischen Tumoren. Der transiente Anstieg des Biolumineszenzsignals in subkutanen GL261/HRE-Luc Tumoren mit einer Reduktion gegen Ende des Experimentes trotz anhaltend hohem Grad an Hypoxie, könnte mit einem HIF-induzierten Feedback Mechanismus oder dem Einfluss der angestiegenen Nekrose gegen Ende des Experimentes erklärt werden. Die histologische Analyse der von HIF kontrollierten Proteinen zeigte, dass GLUT1 und CA9 weitgehend mit hypoxischen Regionen in subkutanen Tumoren kolokalisiert sind, während sie in orthotopen Tumoren auch in nicht-hypoxischen Regionen exprimiert wurden. Das deutet darauf hin, dass die HIF Regulation in orthotopen Tumoren noch zusätzlich von Hypoxie unabhängigen Faktoren aktiviert wird. Zum Beispiel würde die HIF Aktivität auch unter normoxischen Bedingungen gesteigert werden durch Prozesse, welche die Verfügbarkeit von Kofaktoren reduzieren, die für den proteasomalen Abbau von HIF benötigt werden.

Zusammenfassend haben die Experimente dieser Doktorarbeit gezeigt, dass die HIF Regulation während der Glioblastoma Tumorentwicklung mit Hilfe eines zeitlich verlaufenden Ansatz kombiniert mit einer Luciferase Reporter Gen Messung untersucht werden kann. Wir zeigten einen vorübergehenden Anstieg des HIF Signalweges in subkutanen und zu einer geringeren Masse in orthotopischen GL261 Tumoren. Weiter konnten wir signifikante Unterschiede in der Hypoxie und dem Hypoxie Signalweg zwischen den zwei Implantationsstellen zeigen. Die orthotopen Tumore waren weniger hypoxisch, möglicherweise begründet durch ihre Einbettung in eine stark vaskularisierte Region. Zudem deuteten die orthotopen Tumore auf Hypoxie-unabhängige Aktivierung des HIF Signalweges hin. Während diese Reporter Gen basierenden Ansätze eine nützliche Technologie für experimentelle Studien darstellen, die einen detaillierten Einblick in die biologischen Prozesse von lebenden Organismen ermöglichen, können sie jedoch nicht in klinischen Studien übertragen werden. Übertragbare *Imaging* Verfahren könnten eher exogene Proben für HIF Zielgene verwenden die mit fluoreszierender *Imaging* Proben, MRI oder PET kompatibel sind. Zusätzlich wäre es von grossem Interesse für zukünftige Studien, den HIF Signalweg im Zusammenhang mit der Tumor-Mikroumgebung Interaktion zu analysieren.