

# Dual targeting of FGFR1 and VEGFR1 displays antitumor efficacy in breast cancer



Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Kristina Golfmann  
aus Karaganda, Kasachstan

Köln 2017

**Berichterstatter (Gutachter):**

1. **Gutachter:** Prof. Dr. Peter Nürnberg
2. **Gutachter:** Prof. Dr. Jürgen Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2017

## Contents

<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>5</b>
1.1 Cancer	6
1.1.1 Classification of breast cancer subtypes	6
1.1.2 Hallmarks of cancer	8
1.2 FGFR1 – receptor tyrosine kinases as therapeutic targets	12
1.2.1 Structure and function of receptor tyrosine kinases	12
1.2.2 The fibroblast growth factor receptor	12
1.2.3 Structure & function of FGFR1	13
1.2.4 The FGFR1- $\beta$ isoform in breast cancer	15
1.2.5 Aberrant FGFR signaling in cancer	16
1.2.6 Targeting the FGFR1 pathways in breast cancer	19
1.3 Angiogenic role of FGFR1 in breast cancer	22
1.3.1 The process of angiogenesis	22
1.3.2 VEGFR1 in human cancer breast cancer	23
1.3.3 Interaction between FGFR1 & VEGFR1	25
1.4 Aim of the thesis	26
<b>2 Materials and Methods</b>	<b>27</b>
2.1 Materials	28
2.1.1 Chemicals & compounds	28
2.1.2 Mouse strains & human cell lines	28
2.1.3 Plasmids & primer	28
2.1.3.1 Sequence Primer	29
2.1.3.2 Real-Time PCR primer sequences	29
2.1.4 Knockdown shRNAs and knockout gRNAs	29
2.1.5 Enzymes & dyes	30
2.1.6 Buffers & reagents	31
2.1.7 Primary and secondary antibodies for Western Blot and IHC	31
2.2 Methods	33
2.2.1 Molecular biological methods	33

2.2.1.1	Isolation of genomic DNA & RNA.....	33
2.2.1.2	Reverse transcription.....	33
2.2.1.3	Polymerase chain reaction (PCR).....	33
2.2.1.4	Agarose gel electrophoreses.....	34
2.2.1.5	Sanger-Sequencing.....	35
2.2.1.6	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	35
2.2.1.7	Copy number assay.....	36
2.2.2	Cell biological methods.....	37
2.2.2.1	Cultivation of cell lines.....	37
2.2.2.2	Cell viability assay.....	38
2.2.2.3	Stimulation of breast cancer cells.....	38
2.2.2.4	Measurement of VEGF-A secretion.....	38
2.2.2.5	Cloning of short-hairpin constructs for knockdown.....	39
2.2.2.6	Lentiviral and retroviral transfection.....	40
2.2.2.7	CRISPR/Cas9 _Knockout.....	41
2.2.3	Protein-biochemical methods.....	41
2.2.3.1	Protein extraction for Western Blot analysis.....	41
2.2.3.2	Western Blot analysis.....	42
2.2.4	<i>In vivo</i> methods.....	43
2.2.4.1	Orthotopic breast cancer model.....	43
2.2.4.2	Establishment of patient-derived xenografts.....	43
2.2.4.3	Measurement of tumor volume.....	44
2.2.4.4	Bioluminescent reporter imaging (BLI).....	44
2.2.4.5	Immunohistochemistry (IHC).....	44
2.2.4.6	Quantification of IHC.....	45
2.2.4.7	Tissue microarray from breast cancer patients.....	45
2.2.5	Statistics.....	45
<b>3</b>	<b>Results</b>	<b>46</b>
3.1	FGFR1 signaling in breast cancer cell lines.....	47
3.1.1	<i>FGFR1</i> amplification & expression.....	47
3.1.2	FGFR1 downstream signaling.....	48
3.1.3	FGFR1 inhibition & knockdown in cell lines.....	48
3.1.4	FGFR1 inhibition & knockdown in orthotopic tumors.....	51
3.1.5	FGFR1 overexpression in orthotopic tumors.....	53

3.2	FGFR1 activates VEGF-VEGFR1 feed-forward loop .....	55
3.2.1	FGFR1 regulates VEGF-A secretion & expression .....	55
3.2.2	VEGF-A secretion upon FGFR1 inhibition & knockdown .....	56
3.2.3	Activation of VEGFR1-VEGF-A loop .....	57
3.2.4	CRISPR/Cas9 knockout of VEGFR1 .....	58
3.2.5	VEGF-A secretion upon VEGFR1 knockout.....	59
3.2.6	Co-activation of VEGFR1 via PI3K/AKT signaling .....	60
3.3	FGFR1 & VEGFR1 inhibition in orthotopic breast cancer tumors .....	62
3.3.1	Validation of selected inhibitors .....	62
3.3.2	Inhibition of FGFR1 & VEGFR1 with Lucitanib <i>in vivo</i> .....	62
3.3.3	Lucitanib treatment downregulates AKT activity .....	67
3.3.4	Inhibition of FGFR1 & VEGFR1 with BGJ398 & Zactima <i>in vivo</i> ..	67
3.4	Verify interaction of FGFR1 and VEGFR1.....	72
3.4.1	FGFR1 & VEGFR1 inhibition in FGFR1 overexpressed tumors .....	72
3.4.2	CRISPR/Cas9 knockout of VEGFR1 <i>in vivo</i> .....	73
3.5	The FGFR1- $\beta$ isoform .....	74
3.5.1	CRISPR/Cas9 generated FGFR1- $\beta$ isoform.....	74
3.6	Expression of FGFR1 & VEGFR1 in breast cancer patients .....	76
3.6.1	TMA of human breast cancer patients .....	76
3.6.2	TCGA analysis of human breast cancer .....	77
3.7	FGFR1 and PI3K inhibition in sqNSCLC .....	78
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>79</b>
4.1	FGFR1 and VEGFR1 synergizes to promote tumor growth .....	80
4.2	Targeting FGFR1 and VEGFR1 in TNBC .....	81
4.3	Additional factors to mitigate FGFR1 sensitivity.....	82
4.4	Co-activating factors and AKT-dependent FGFR1 signaling .....	85
<b>5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Reference</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Attachments</b>	<b>99</b>
7.1	Abbreviations.....	100
7.2	List of figures.....	102
7.3	List of tables .....	104

7.4	Erklärung zur Dissertation .....	105
7.5	Acknowledgment .....	106
7.6	Curriculum Vitae.....	107

*Für meine Eltern*

## Summary

Genomic alteration of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) is associated with a poor prognosis in different cancer types, including breast cancer. In particular *FGFR1* amplification is found in around 15 % of all breast cancer cases, predominately in luminal B and triple negative breast cancer (TNBC). *FGFR1* amplification was postulated as a promising marker to predict response against FGFR inhibitors. However, clinical activity of selective pan-FGFR inhibitors, such as BGJ398, has been disappointing in *FGFR1* amplified breast cancer. In contrast, multitargeted tyrosine kinase inhibitors (mTKIs), targeting not only FGFR but also further receptors such as the vascular endothelial growth factor receptor family (VEGFR), demonstrated compelling antitumor activity in FGF-aberrant breast cancers. However, the molecular basis of response and resistance to FGFR-dependent therapy is so far unknown and predictive biomarkers are clearly needed. Hence, to fill the gap the current study endeavored to investigate the oncogenic role of FGFR1 and to understand the mode of action of mTKIs in *FGFR1* amplified breast cancer.

The results presented in this study revealed a direct relationship between FGFR1 and VEGFR1 interaction to promote tumor angiogenesis and growth in *FGFR1* amplified breast cancer. First, FGFR1 signaling was shown to modulate VEGF-A expression and secretion, thereby activating an AKT-dependent autocrine VEGF-A\_VEGFR1 loop. Moreover, pharmacological inhibition or knockout of VEGFR1 not only leads to a significant reduction of VEGF-A levels but also to deactivation of the AKT pathway. Second, combined inhibition of FGFR1 and VEGFR1 in orthotopic breast tumors resulted in complete tumor growth reduction concomitant with reduced AKT activation. These findings highlight that *FGFR1* amplified breast cancer is severely impaired by autocrine VEGFR1\_VEGF-A signaling and anti-tumor activity is influenced by AKT signaling. Finally, tissue microarray (TMA) analysis of FGFR1 and VEGFR1 expression confirmed a co-expression of both receptors in a subgroup of luminal B and TNBC patients.

In conclusion, the presented study indicates an angiogenic, tumor-promoting role of FGFR1 and VEGFR1 interaction, thereby suggesting that breast cancer patients with elevated levels of both receptors could benefit profoundly from a combined specific FGFR1 and VEGFR1 inhibition.



## Zusammenfassung

Die genomische Veränderung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR, engl.: *fibroblast growth factor receptor*) ist verbunden mit einer schlechten Prognose bei verschiedenen Krebsarten, einschließlich Brustkrebs. Insbesondere kommt eine *FGFR1* Amplifikation bei etwa 15 % aller Brustkrebspatienten vor, überwiegend im Luminal B und Triple-negativen Mammakarzinom (TNBC, engl.: *triple negative breast cancer*). Eine *FGFR1* Amplifikation wurde als prognostischer Marker in präklinischen Studien postuliert und unterschiedliche FGFR Inhibitoren, sowohl spezifische als auch Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren (mTKIs), sind bereits in der klinischen Entwicklung. Allerdings ist die Anti-Tumor Aktivität bisher von selektiven pan-FGFR Inhibitoren, wie BGJ398, im *FGFR1*-amplifizierten Mammakarzinom enttäuschend. Im Gegensatz dazu zeigten mTKIs, die nicht nur FGFR1 sondern auch weitere Rezeptoren wie VEGFR (engl.: *vascular endothelial growth factor receptor*) inhibieren, eine erfolgsversprechende klinische Aktivität bei einigen Brustkrebspatienten. Der zugrundeliegende molekulare Wirkungs- und Resistenzmechanismus ist bislang jedoch unbekannt und geeignete Marker fehlen, um ein Therapieansprechen vorherzusagen. Das Ziel meiner Arbeit war es daher, den FGFR1 Signalweg in Brustkrebs zu analysieren, um mögliche Rezeptor-Interaktionen zu untersuchen und somit prognostische Biomarker zu identifizieren.

Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von FGFR1 und VEGFR1 nicht nur die Angiogenese, sondern auch das Tumorwachstum fördert. Mithilfe von *FGFR1*-amplifizierten Brustkrebs-Zelllinien konnte demonstriert werden, dass eine Stimulierung des FGFR1 Signalwegs zu einer VEGF-A Expression und Sekretion führt, wodurch eine AKT-abhängige autokrine VEGF-A\_VEGFR1-Schleife aktiviert wird. Darüber hinaus führt die pharmakologische Hemmung bzw. ein Knockout von VEGFR1 nicht nur zu einer signifikanten Reduktion von VEGF-A, sondern auch zur Deaktivierung des AKT Signals. Die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wurden mittels einem *FGFR1*-amplifizierten orthotopen Mausmodell, das ich im Rahmen meiner Arbeit etabliert habe, bestätigt. So führte eine Therapie mit dem mTKI Lucitanib bzw. eine Kombinationstherapie mit einem spezifischen FGFR und VEGFR Inhibitor zu einem stark verminderten Tumorwachstum im *FGFR1*-amplifizierten Brustkrebs-Modell. In der post-therapeutischen Analyse dieser Tumore konnte sowohl eine Reduzierung des AKT Signals als auch eine verminderte VEGF-A Expression nachgewiesen werden. Schlussendlich wurde mittels TMA (engl.: *Tissue Microarray*)

eine Co-Expression von FGFR1 und VEGFR1 auf den Tumorzellen von Mammakarzinom-Gewebeproben von Luminal B- und TNBC-Patienten nachgewiesen. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse meiner Arbeit den Schluss zu, dass die AKT-abhängige Aktivierung von VEGFR1 und die autokrine VEGF-A\_VEGFR1-Schleife maßgeblich zum FGFR1 Signalweg beitragen. Tumorwachstum und Angiogenese werden durch die Interaktion von FGFR1 und VEGFR1 reguliert und das AKT Signal beeinflusst die Anti-Tumoraktivität unter FGFR1 Inhibierung. Besonders im Hinblick auf Brustkrebspatienten mit erhöhter Expression von beiden Rezeptoren ist die kombinierte Inhibition von FGFR1 und VEGFR1 ein vielversprechender Therapieansatz. Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, Patienten aufgrund ihrer Rezeptorexpression auf den Tumorzellen besser für eine zielgerichtete Therapie zu selektionieren.