

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt  
Leiter experimentelle Chirurgie: Prof. Edward K. Geissler, PhD

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

---

**Verbesserte Wirksamkeit der FGFR Blockade durch mTOR  
Inhibition im HCC Modell**

---

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Tobias Philipp Scheller

2015



Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt  
Leiter experimentelle Chirurgie: Prof. Edward K. Geissler, PhD

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

---

**Verbesserte Wirksamkeit der FGFR Blockade durch mTOR  
Inhibition im HCC Modell**

---

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Tobias Philipp Scheller

2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Sven A. Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Andreas Teufel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2015

GEWIDMET MEINEN ELTERN

## **Eingereichte Dissertation als Publikation**

Diese Publikationsdissertation basiert auf folgender Veröffentlichung:

### **mTOR inhibition improves fibroblast growth factor receptor targeting in hepatocellular carcinoma.**

Scheller T, Hellerbrand C, Moser C, Schmidt K, Kroemer A, Brunner S, Schlitt HJ, Geissler EK, Lang SA.

British Journal of Cancer 2015. Mar 3;112(5):841-850. doi: 10.1038/bjc.2014.638.

Epub 2015 Feb 17. PubMed PMID 25688743

**Impact factor:** 4,817

Der Impact Factor bezieht sich auf den Journal Citation Report 2013 laut ISI (Institute for Scientific Information; <http://isiknowledge.com/jcr>).

Hinweis:

Für die Dissertation wurden nur ausgewählte Graphiken verwendet. Weitere Abbildungen können in der Originalpublikation am Ende der Arbeit eingesehen werden.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	8
1.1. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) .....	8
1.2. Tumorangiogenese .....	8
1.3. Das „fibroblast growth factor“/„fibroblast growth factor receptor“ (FGF/FGFR) System .....	9
1.4. „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) .....	10
2. Zielsetzung der Arbeit .....	11
3. Material und Methoden .....	12
3.1. Zellkultur .....	12
3.2. MTT-Test – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test .....	12
3.3. Migrationsassay .....	13
3.4. Western Blotting .....	13
3.5. Real-Time-PCR (RT-PCR) .....	14
3.6. Tierversuche .....	14
3.7. Immunhistochemie .....	15
3.8. Statistik .....	16
4. Ergebnisse .....	17
4.1. Expression von FGFRs in Tumorzellen und Stromazellen .....	17
4.2. Wirkungen von BGJ398 auf Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	17
4.3. Effekte von BGJ398 auf Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	19
4.4. Einfluss der Blockade mit BGJ398 auf Perizyten <i>in vitro</i> .....	20
4.5. Wirkungen von BGJ398 auf HSCs <i>in vitro</i> .....	20
4.6. Beeinflussung des Tumorwachstums in Tiermodellen .....	21
5. Diskussion .....	25
6. Zusammenfassung der Arbeit .....	28
7. Abkürzungen .....	30
8. Literaturverzeichnis .....	31
9. Anhang .....	36
10. Lebenslauf .....	37
11. Danksagung .....	39
12. Abdruck der Publikation .....	40

## **1. Einleitung**

### **1.1. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)**

Lebertumore stellen weltweit die sechsthäufigste Tumorentität dar. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist hierunter der mit Abstand häufigste Tumor und insgesamt sogar die dritthäufigste Ursache tumorassoziierter Todesfälle (1). Das HCC entwickelt sich meist auf dem Boden einer chronischen Grunderkrankung (Leberzirrhose), die z.B. durch eine virale Hepatitis, chronischen Alkoholabusus oder nichtalkoholische Leberverfettung (Steatohepatitis) bedingt ist (2). Nach wie vor stellt die chirurgische Resektion oder Lebertransplantation die einzige potentiell kurative Möglichkeit zur Behandlung des HCCs dar. Häufig wird das HCC jedoch erst in weit fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert oder Patienten sind aufgrund der zugrunde liegenden Erkrankung für eine operative Therapie nicht geeignet, so dass es neuerer Therapiestrategien und -möglichkeiten zur Behandlung dieses Tumors bedarf (3). Die bislang vorhandenen systemischen Therapieoptionen zeigen jedoch nur eine unzureichende oder keine Wirksamkeit. Lediglich klinische Studien mit dem Multityrosinkinase-Inhibitor Sorafenib, der u.a. die Tumorangio-genese durch Hemmung von „vascular-endothelial growth factor“ (VEGF)-Rezeptoren und Raf-Kinasen inhibiert, konnten einen mäßigen Erfolg verbuchen (4; 5; 6).

### **1.2. Tumorangio-genese**

Das Wachstum von Gefäßen, d.h. die Tumorangio-genese wird durch verschiedene Faktoren wie „vascular-endothelial growth factors“ (VEGFs), „platelet-derived growth factors“ (PDGFs) und „fibroblast growth factors“ (FGFs), die sowohl von Tumor- als auch von Stromazellen sezerniert werden, gefördert. Entsprechend können Therapien, die sich gegen diese Faktoren richten, Angriffspunkte zukünftiger Behandlungsstrategien darstellen (7; 8; 9). Das HCC ist ein stark hypervaskularisierter Tumor, so dass die Inhibition der Tumorangio-genese hier vielversprechend zu sein scheint (10; 11). Bei Patienten mit fortgeschrittenen und metastasierten Tumorstadien sind erhöhte Serumkonzentrationen von VEGF-A, dem wichtigsten angiogenen Faktor, beschrieben und mit einer schlechteren Gesamtprognose

assoziiert (12; 13; 14). Zudem spielen die Wachstumsfaktoren aFGF und bFGF für die Angiogenese eine entscheidende Rolle, da sie zur Rekrutierung und Aktivierung von Endothelzellen beitragen können (15). Eine vermehrte Serumkonzentration von bFGF, die bei einer Vielzahl an Patienten mit HCC nachgewiesen werden konnte, korreliert mit der Gefäßdichte des Tumors und dem Wiederauftreten (Rezidiv) nach chirurgischer Resektion (16; 17). Blockade des FGFR Systems könnte daher einen therapeutischen Ansatz in der Therapie des HCC darstellen.

### **1.3. Das „fibroblast growth factor“/„fibroblast growth factor receptor“ (FGF/FGFR) System**

Das FGF/FGFR System, bestehend aus vier Rezeptoren (FGFR1-4) und 18 Liganden (FGFs) (18), spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese verschiedener Tumore (19; 20). Auf funktioneller Ebene hat die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, MAPK/ERK und PI3K/AKT, durch Ligandenbindung an den FGFR verschiedene Wirkungen auf das Verhalten von Tumorzellen. Beispielsweise wird die Proliferation und Migration von Tumorzellen durch FGFR Aktivierung gefördert (21). In der Literatur beschrieben ist zudem eine Resistenzentwicklung gegen anti-angiogene Therapien durch Aktivierung des FGF/FGFR Systems (22; 23). Eine weitere wichtige Bedeutung wird dem FGF/FGFR System bei der Rekrutierung von Gewebezellen, hier v.a. von Endothelzellen und hepatischen Sternzellen (HSCs), zugesprochen, welche essentiell für die Entwicklung des HCCs sind (24; 25).

BGJ398 bzw. 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-Harnstoff ist ein oral verfügbarer Inhibitor der FGF Rezeptortyrosinkinasen 1, 2 und 3 (26). Die Wirkung von BGJ398 konnte in mehreren präklinischen Versuchsreihen, u.a. bei rhabdoiden Tumoren, Kolon- und Endometriumkarzinomen bereits nachgewiesen werden (27; 28; 29). Zudem befindet sich der Inhibitor in ersten klinischen Phase I Untersuchungen.

Bisher durchgeführte klinische Studien zur FGFR Blockade im HCC führten allerdings nicht zu den erwünschten Erfolgen (30). Daher entschlossen wir uns im Verlauf der

Untersuchungen, die medikamentöse FGFR Inhibition mit einer weiteren zielgerichteten Therapieoption zu kombinieren.

#### **1.4. „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR)**

mTOR (auch FRAP, RAPT-1 oder RAFT-1 genannt) stellt eine ubiquitär vorhandene Serin-Threonin-Proteinkinase dar, die in die Regulation diverser zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Migration und Proliferation involviert ist. Die Bedeutung des mTOR Signalweges bei malignen Prozessen wurde in den letzten Jahren zunehmend besser verstanden (31). Durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Zytokinen (wie IGF-1/2, VEGF-A, FGFs) wird u.a. der sogenannte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg aktiviert. Aktivierung des mTOR Signalweges geht mit weniger differenzierten Tumoren, einer schlechteren Prognose und einem früheren Wiederauftreten nach Resektion beim HCC einher (32; 33). Besondere Bedeutung erlangt der mTOR Komplex durch die Möglichkeit der therapeutischen Intervention mit mTOR Inhibitoren, wie beispielsweise Rapamycin. In präklinischen Modellen, u.a. beim HCC, führte die Behandlung mit Rapamycin neben Effekten auf Tumorzellen insbesondere zu einer Hemmung von Rekrutierung und Aktivierung von Perizyten bzw. Stromazellen (34; 35; 36). Die bislang vorhandenen klinischen Daten zur alleinigen mTOR Inhibition im HCC zeigen jedoch nur eine mäßige Wirksamkeit (37). Daher könnte die Kombinationsbehandlung mit einem weiteren zielgerichteten Medikament eine erfolgversprechende Option darstellen.

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Effekte zum einen der pharmakologischen FGFR Blockade mit dem „small molecule“ Inhibitor BGJ398 auf Tumor- und Stromazellen *in vitro*, sowie auf das Tumorwachstum *in vivo*. Aufgrund der Ergebnisse wurde im Verlauf der Untersuchungen zudem eine Kombination von FGFR und mTOR Blockade im HCC Modell untersucht.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

Für unsere Experimente verwendeten wir die humanen HCC-Zelllinien Huh-7 und HepG2 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), die murine Hepatomzelllinie Hepa129 (C3H-Basis) (Prof. Schmitz, Bonn) sowie Endothelzellen (ECs – „endothelial cells“) (Provitro, Berlin, Deutschland), glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs – „vascular smooth muscle cells“) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und hepatische Sternzellen (HSC – „hepatic stellate cells“) (Prof. Hellerbrand, Regensburg). Zur Kultivierung wurden die Tumorzellen in „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM, Lonza, Basel, Schweiz) mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS – „fetal calf serum“) behandelt und in einem Brutschrank bei einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Sättigung und einer Temperatur von 37°C in Kultur gehalten. Das konditionierte Medium (CM – „conditioned medium“) wurde mit Hilfe der HCC Zelllinien Huh-7 und HepG2 hergestellt (38). Die rekombinanten Wachstumsfaktoren aFGF und bFGF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) kamen für die Versuche zum Einsatz. Der FGFR Inhibitor BGJ398 wurde von Novartis Oncology (Basel, Schweiz) bereitgestellt. Dieser wurde für die *in vitro* Versuche in Dimethylsulfoxid (DMSO) und für die *in vivo* Experimente in Wasser aufgelöst. Rapamycin (Wyeth, Madison, NJ, USA) wurde *in vivo* in Wasser und *in vitro* in Zellkulturmedium gelöst.

#### **3.2. MTT-Test – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test**

Um die zytotoxischen Effekte von BGJ398 auf Tumorzellen, ECs, VSMCs und HSCs zu analysieren, wurden jeweils 2000 Zellen bei den Tumorzellen und HSCs und je 4000 Zellen bei den ECs und VSMCs in 96-Loch-Platten pipettiert. Unter verschiedenen Konzentrationen des BGJ398s und Zugabe von bFGF wurden die Zellen für 24, 48 und 72h sowohl in Vollmedium als auch in Serum-reduzierten Medium (1% FCS in DMEM) kultiviert. Vitale Zellen können den ihnen angebotenen gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu Formazan (blau-violett) abbauen. Durch die MTT-Lösung und Abstoppen der Reaktion mit DMSO kann die Veränderung mittels eines Photometers bei

einer Wellenlänge von 590nm abgelesen werden. Die Farbintensität und Vitalität sind direkt proportional zu einander.

### **3.3. Migrationsassay**

Die Auswirkungen von BGJ398 auf die Zellmotilität *in vitro* wurden mittels Migrationsassays in modifizierten Boyden-Kammern (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) untersucht. Hierzu wurden je 50.000 Zellen der zu untersuchenden Zelllinien in 1% FCS-DMEM resuspendiert und in die Einsätze mit einer 8µm großen Poren gegeben. Als Anreiz für die Migration der Tumorzellen wurden in den unteren Behältnissen verschiedene Chemotaxine wie aFGF und bFGF mit einer Dosierung von jeweils 50ng/ml verwendet. Bei den ECs, Perizyten und HSCs wurde konditioniertes Medium von HepG2 und Huh-7 sowie bFGF verwendet. Nach 24 und 48h wurden die migrierten Zellen Wright-Giemsa gefärbt und mikroskopisch in vier zufällig ausgewählten Feldern gezählt.

### **3.4. Western Blotting**

Die Wirksamkeit von BGJ398 auf onkogene Signaltransduktionskaskaden wurde mit Hilfe von Western Blots untersucht. Bei einer Zelldichte von 60-70% wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an BGJ398 und Wachstumsfaktoren (aFGF, bFGF) behandelt. Im Anschluss an die Lyse der Zellen durch einen Lysepuffer (siehe Anhang) und Zentrifugieren wurde mittels der Bradford-Methode die Konzentration der Proteine im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm ausgemessen. Danach wurden jeweils 40µg Proteinproben elektrophoretisch mit der denaturierenden 10%igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in ihre Komponenten aufgetrennt und anschließend von den Laufgelen auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Nach Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern gegen pAkt<sup>Ser473</sup>, Akt, pERK<sup>Tyr202/204</sup>, ERK, c-myc (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), PDI und β-actin (Santa Cruz, CA, USA) und Andocken durch einen Sekundärantikörper konnten diese durch Chemilumineszenz dargestellt werden.

### 3.5. Real-Time-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis der Wirkung von BGJ398 auf die Expression von VEGF-A, bFGF, PDGF-B, FGFRs und Tie2 wurde eine RT-PCR mit dem LightCycler® System (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe von TRIzol (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) isoliert, gereinigt und durch reverse Transkription in cDNA (copy DNA) umgeschrieben. Hypoxische Bedingungen wurden *in vitro* durch Deferroxamin (DFX, 100 µM) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) imitiert. Um die VEGF-A Sekretion in Überständen von HCC Zellen nachweisen zu können, wurde das ELISA Kit (BioSource, Nivelles, Belgien) nach Maßgabe des Herstellers verwendet.

### 3.6. Tierversuche

Der Effekt der FGFR Blockade auf das Tumorwachstum wurde anschließend *in vivo* verifiziert. Wir verwendeten hierfür ein xenogenes Nacktmausmodell (Balb-c<sub>nu/nu</sub>, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) sowie ein syngenes Tumormodell (C3H Mäuse; Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Versuche waren durch die Tierkommission und die Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt.

In einem ersten xenogenen Modell wurde in jeder Versuchsgruppe (n=6-8 Tiere/Gruppe)  $1 \times 10^6$  Huh-7-Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach Randomisierung und Einteilung in Kontroll- und Behandlungsgruppen begannen wir ab einer Tumorgroße von  $100 \text{mm}^3$  die Behandlung mit BGJ398 5mg/kg Körpergewicht täglich (Behandlungsgruppe 1) oder 25mg/kg Körpergewicht dreimal wöchentlich (Behandlungsgruppe 2) über eine orale Gavagier-Sonde. Am 30. Tag nach Injektion der Tumorzellen wurde der Versuch beendet, die Tumore exzidiert und gewogen. Ein zweites subkutanen, syngenes Modell mit C3H-Mäusen (n=8-9 Tiere/Gruppe) und Hepa129-Zellen ( $2,5 \times 10^5$ ) wurde nach dem gleichen Versuchsaufbau durchgeführt. Nach Beendigung am 14.Tag der Behandlung wurden die Tumoren, ebenso wie im ersten Modell, entfernt und gewogen.

Für das orthotope Tumormodell verwendeten wir wiederum Hepa129-Zellen ( $5 \times 10^4$ ) in C3H-Mäusen (n=6-8/Gruppe). Die Tumorzellen wurden nach Laparotomie in den linken

Leberlappen implantiert. Am siebten Tag nach Implantation erfolgte die Randomisierung und Aufteilung in vier verschiedene Behandlungsgruppen (Kontrolle mit Vehikel, tägliche Behandlung mit BGJ398 5mg/kg (p.o.) oder Rapamycin 0,2mg/kg (i.p.) und eine Kombination aus BGJ398 und Rapamycin). Da durch vorangegangene Ergebnisse der Arbeitsgruppe deutliche Effekte der mTOR Blockade auf die Rekrutierung von Perizyten (VSMCs) gezeigt werden konnten, entschieden wir uns, Rapamycin als Einzeldosis und in Kombination mit BGJ398 diesem Experiment beizufügen. Die Behandlung wurde für einen Zeitraum von 12 Tagen durchgeführt. Der Versuch wurde dann aufgrund von tumorassoziierten Symptomen in der Kontrollgruppe beendet. Nach Versuchsende wurden die Tumore exzidiert, gewogen, vermessen und für die anschließenden immunhistochemischen Untersuchungen eingebettet.

### **3.7. Immunhistochemie**

Von den eingebetteten und kryofixierten Tumoren des orthotopen Modells wurden mit einem Mikrotom Schnitte für die weiteren immunhistochemischen Analysen hergestellt.

Zur Evaluierung der Tumorzellvaskularisation (Gefäßdurchmesser) und des Wachstum der Perizyten innerhalb des Tumors wurden für immunhistochemische Färbungen nach Fixierung der Gewebeschnitte in Aceton und Chloroform als Panendothelmarker der Ratte-anti-Maus Primärantikörper CD31/PECAM-1 (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und ein Ziege-anti-Ratte Sekundärantikörper sowie der Primärantikörper Maus-anti- $\alpha$ SMA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Sekundärantikörper Ratte-anti-Maus verwendet. Durch Diaminobenzidin wurde die Bindung der Antikörper sichtbar gemacht. Im Anschluss wurden bei 20facher Vergrößerung im Mikroskop jeweils vier Aufnahmen des Tumorschnittes erstellt, mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* (Version 1.46r) in Graustufen überführt und schließlich die Gefäßfläche als Pixel/Gesichtsfeld ausgewertet.

Zur Analyse der proliferierenden Tumorzellen erhielten die Mäuse jeweils zwei Stunden vor Beendigung des Versuchs eine intraperitoneale Injektion von 1mg Bromodeoxyuridin (BrdU; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) pro Maus. Mit Hilfe eines BrdUrd Detektion Kits (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wird die Aufnahme des BrdUs in den Tumoren

sichtbar. Die anschließende Inkubation der hergestellten Schnitte erfolgt mit einem Streptavidin-konjugiertem Meerrettichperoxidase-markiertem Ziege-anti-Maus IgG<sub>2</sub>-Sekundärantikörper und Sichtbarmachen der Antikörperbindung mit Diaminobenzidin. Unter dem Mikroskop bei 20facher Vergrößerung wurden vier Gesichtfeldauschnitte aufgenommen, die BrdU-positiven Zellen gezählt und der Durchschnitt ermittelt.

Um die Apoptoserate der Tumorzellen beurteilen zu können, verwendeten wir die TUNEL (=„TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“) Färbung nach Protokoll (Promega, Heidelberg, Deutschland). Die bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente können mittels der terminalen Desoxynucleotidyltransferase (TdT) markiert werden. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes gelingt die Darstellung der apoptotischen Zellkerne. Unter 20facher Vergrößerung wurden zur Auswertung vier Gesichtfeldauschnitte aufgenommen und die TUNEL-positiven Zellen gezählt. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert abschließend ermittelt.

### **3.8. Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat (Version 3.0). Zum Ausschluss von signifikanten Ausreißern in den *in vivo* Versuchen wurde der Grubb's Test ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) verwendet. Die Varianzanalyse bezüglich tumorbedingter Variablen bei *in vivo* Experimenten wurde mittels Mann-Whitney-U-Test und dem ANOVA-Test geprüft. Zur Analyse der Ergebnisse der *in vitro* Versuche diente der Zweistichproben-t-Test. Die Ergebnisse der Migrationsassays werden als Relativwerte zu den Kontrollen angegeben. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## **4. Ergebnisse**

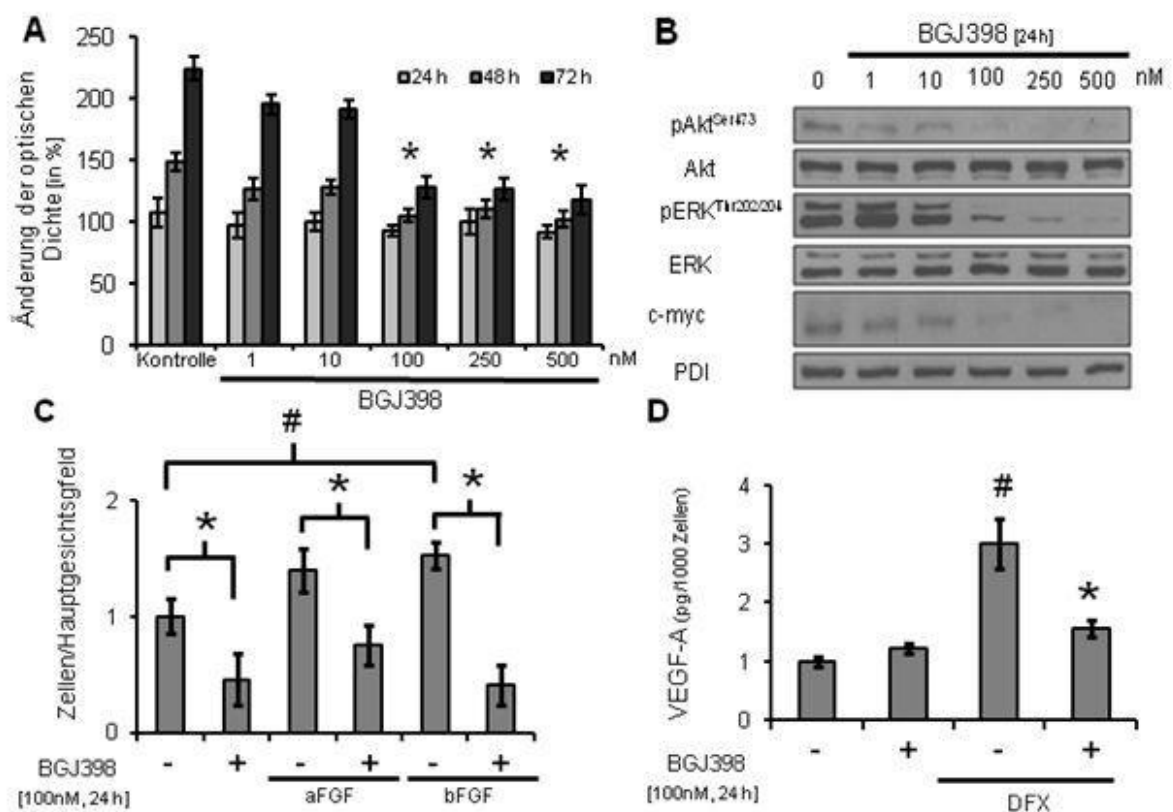
### **4.1. Expression von FGFRs in Tumorzellen und Stromazellen**

In einem ersten Schritt wurde mittels RT-PCR die Expression von FGFRs als mögliches Angriffsziel für BGJ398 in den Tumorzelllinien und Stromazellen bestimmt. Hier zeigten die beiden Tumorzelllinien Huh-7 und HepG2 eine Expression von FGFR1, FGFR2IIIc, FGFR3 und FGFR4, während FGFR2IIIb in Huh-7 überhaupt nicht und in HepG2 nur sehr gering exprimiert wurde. Bei Stromazellen konnte eine Expression von FGFR1, FGFR3 und FGFR4 nachgewiesen werden, wobei diese für FGFR3 in HSCs und für FGFR4 in Endothelzellen nur schwach war. FGFR2IIIb und FGFR2IIIc wurden weder in VSMCs, Endothelzellen noch in HSCs exprimiert.

### **4.2. Wirkungen von BGJ398 auf Tumorzellen *in vitro***

Anschließend wurden die Effekte der pharmakologischen FGFR Blockade mit BGJ398 auf das Wachstum der Tumorzellen *in vitro* untersucht. In MTT Assays zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung des Tumorzellwachstums ab einer Dosis von 100nM BGJ398 nach 72h sowohl in Vollmedium als auch unter Serum-reduzierten Bedingungen (Abb. 1A). Nachfolgend bestimmten wir den Einfluss der FGFR Inhibition auf die konstitutive Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die durch FGFR aktiviert werden können. Die Ergebnisse zeigten eine Hemmung der konstitutiven Akt sowie ERK („extracellular-signal regulated kinase“) Phosphorylierung sowie eine verminderte Expression des Onkogens c-myc bereits nach 4h, jedoch noch eindrücklicher nach 24h (Abb. 1B). Insbesondere Letzteres wird in der Literatur als ein wichtiger Faktor bei der HCC Progression beschrieben (39). Um Effekte auf die Liganden-induzierte Aktivierung der Signalwege darzustellen, erfolgte eine Stimulation der Zellen mittels human rekombinatem bFGF und aFGF. Interessanterweise zeigte bFGF keinen Effekt auf die Akt Phosphorylierung, während die bFGF-induzierte ERK Aktivierung durch BGJ398 geblockt wurde. Eine Stimulation durch aFGF hatte keinerlei Effekte auf die untersuchten Signalwege. Zur Untersuchung funktioneller Konsequenzen wurden abschließend Migrationsassays abgefertigt. Durch BGJ398 ließ sich hierbei eine signifikante

Hemmung sowohl der konstitutiven als auch der bFGF-induzierten Zellmotilität nach 24h nachweisen (Abb. 1C). Passend zu den Ergebnissen der Signalweganalyse, hatte aFGF keinen (signifikanten) Effekt auf die Tumorzellmotilität. Da die Tumorangiogenese eine essentielle Rolle bei der HCC Progression spielt, wurden abschließend die Expression/Sekretion angiogener Faktoren bestimmt. Auf mRNA Ebene zeigte sich hierbei eine signifikante Hemmung der DFX-induzierten VEGF-A und PDGF-B Expression. Der Effekt auf die VEGF-A Sekretion wurde daraufhin im ELISA bestätigt (Abb. 1D). Ein Effekt auf die bFGF mRNA Expression ließ sich nur in HepG2-Zellen, jedoch nicht in Huh-7-Zellen nachweisen.



**Abb. 1:** Auszüge der *in vitro* Ergebnisse der Tumorzellen (anhand Huh-7): **A** MTT Assay: Reduktion des Wachstums der Tumorzellen nach 72h ab 100nM ( $*P < 0.05$ ); **B** Western Blot Analyse: Dosisabhängige Hemmung der ERK und Akt Phosphorylierung sowie verminderte Expression von c-myc; **C** bFGF führt zu einer Induktion der Zellmotilität ( $\#P < 0.05$ ), die signifikant durch BGJ398 gehemmt werden kann ( $*P < 0.05$ ); **D** DFX bewirkt eine vermehrte VEGF-A Sekretion ( $\#P < 0.05$ ), die durch FGFR Blockade verringert wird ( $*P < 0.05$ ).

Zusammenfassend zeigen sich durch die pharmakologische FGFR Blockade mit BGJ398 in HCC Tumorzelllinien eine Hemmung onkogener Signalwege, eine Inhibition der konstitutiven und bFGF-induzierten Motilität sowie eine verminderte Expression von angiogenen Faktoren *in vitro*.

#### **4.3. Effekte von BGJ398 auf Endothelzellen *in vitro***

Stromazellen (Endothelzellen, Perizyten sowie hepatische Sternzellen) sind von entscheidender Bedeutung für Tumorwachstum und Angiogenese beim HCC (40; 41). In der Folge wurde daher zunächst der Effekt der FGFR Blockade mit BGJ398 auf Endothelzellen bestimmt. In MTT Assays zeigte sich eine Hemmung des Endothelzellwachstums nach 72h. Hinsichtlich der Signalkaskaden konnte, ähnlich wie bei den Tumorzellen, eine dosisabhängige Hemmung der konstitutiven ERK Aktivierung, jedoch kein Effekt auf die Akt Phosphorylierung nach 24h beobachtet werden. Interessanterweise erreichte die FGFR Blockade sowohl konstitutiv als auch bFGF-induziert eine Hemmung von c-myc. Stimulation der Endothelzellen mit bFGF führte zu einer Phosphorylierung von ERK, die durch BGJ398 gehemmt werden konnte, während Akt nicht phosphoryliert wurde. Funktionell konnte durch die FGFR Blockade eine signifikante Verringerung sowohl der konstitutiven als auch der bFGF-induzierten Motilität durch BGJ398 in Migrationsassays nachgewiesen werden. Da das lokale Mikromilieu entscheidend zur Aktivierung der Endothelzellen beiträgt, wurden zudem konditionierte Medien der Tumorzelllinien in die Analyse einbezogen. In Migrationsassays zeigte sich eine signifikante Induktion der Endothelzellmotilität, die durch BGJ398 signifikant inhibiert werden konnte. Da Endothelzellen durchaus eine Quelle für angiogene Faktoren darstellen, wurde die Expression von VEGF-A, PDGF-B, bFGF und Tie2 abschließend mittels RT-PCR bestimmt. FGFR Blockade führte zu einer signifikanten Hemmung der konstitutiven VEGF-A mRNA Expression, während die DFX-induzierte VEGF-A mRNA keine Effekte aufwies. Weder konstitutiv noch unter hypoxischen Bedingungen durch DFX konnte eine veränderte PDGF-B oder bFGF mRNA Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde die Expression des Angiopoietinrezeptors Tie2, der mit Resistenz

gegen anti-angiogene Therapieansätzen assoziiert wird, durch BGJ398 auf mRNA Ebene, besonders unter Hypoxie, deutlich gehemmt (42; 43; 44).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Endothelzellen, vor allem durch bFGF Stimulation und unter hypoxischen Bedingungen, auf die Blockade des FGFR mit BGJ398 erfolgreich ansprechen.

#### **4.4. Einfluss der Blockade mit BGJ398 auf Perizyten *in vitro***

Eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Bildung eines funktionierenden Gefäßsystems während der Tumorentstehung spielen Perizyten. Wir nutzten glatte Gefäßmuskelzellen, um diese Zellpopulation zu untersuchen. Hinsichtlich des Zellwachstums konnten weder konstitutiv noch unter bFGF Stimulation Effekte von BGJ398 gezeigt werden. Gleichsam beobachteten wir keinen Effekt der FGFR Inhibition auf die konstitutive oder bFGF-induzierte Migration. Auf Signaltransduktionsebene zeigte sich dennoch ein von BGJ398 verursachter Effekt auf die konstitutive und bFGF-induzierte ERK Phosphorylierung, sowie eine Hemmung von c-myc. Inkubation von Perizyten in konditioniertem Medium der Tumorzellen führte zu einer hoch signifikanten Induktion der Perizytenmigration, die durch BGJ398 allerdings nicht beeinflussbar war. Ebenso konnte die durch DFX-induzierte VEGF-A Expression nicht blockiert werden. Die bFGF mRNA Expression konnte durch FGFR Blockade signifikant induziert werden.

Letztendlich zeigen diese Ergebnisse, dass durch die FGFR Blockade mit BGJ398 nur minimale Effekte bezüglich des Zellwachstums, der Signaltransduktion und Motilität zu erkennen sind, selbst wenn Perizyten mit bFGF oder konditioniertem Medium von Tumorzellen stimuliert werden.

#### **4.5. Wirkungen von BGJ398 auf HSCs *in vitro***

In besonderer Weise haben leberspezifische Perizyten, sogenannte hepatische Sternzellen (HSCs), Einfluss auf die Entwicklung und das Fortschreiten von malignen Lebertumoren (9; 45; 46). Auch hier erfolgte zunächst die Analyse der Wachstumshemmung im MTT Test, die

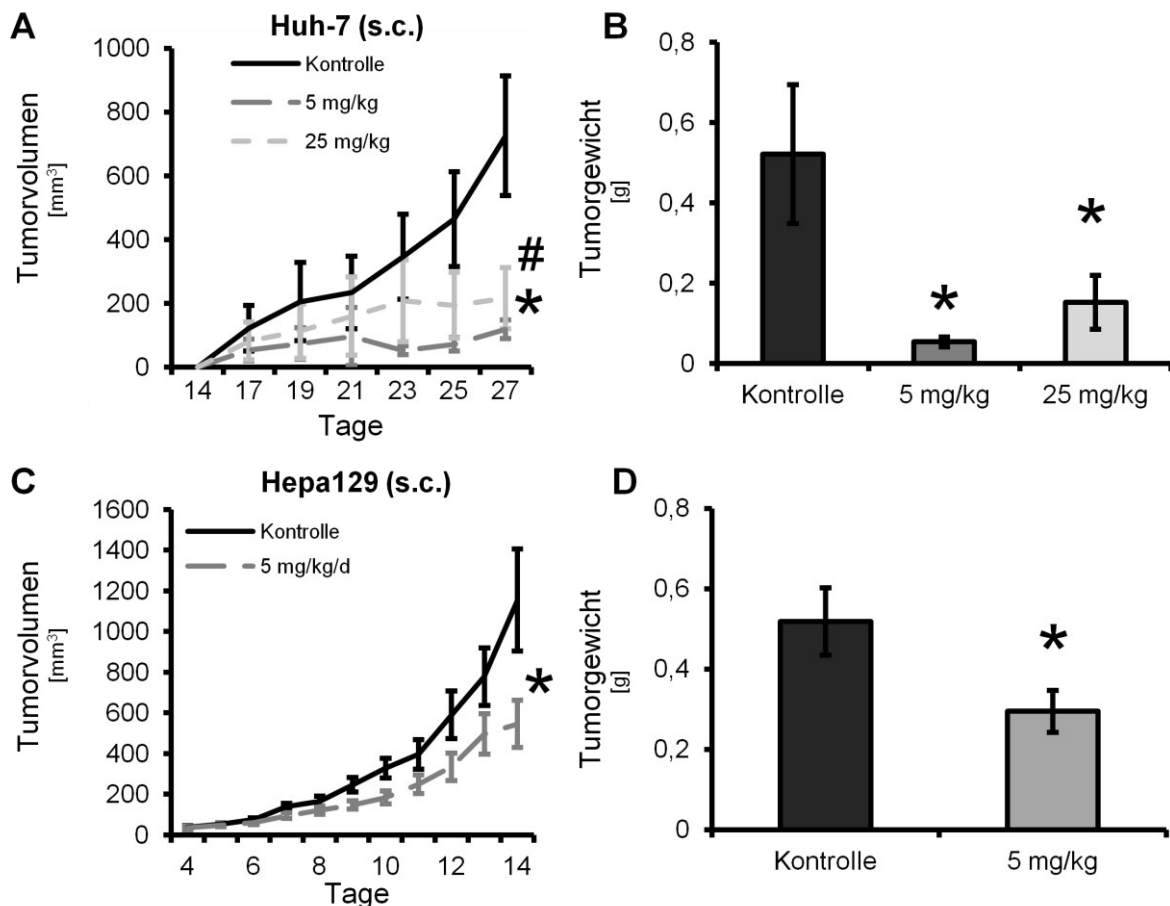
durch BGJ398, besonders nach Stimulation durch bFGF, erreicht werden konnte. Die anschließende Betrachtung der intrazellulären Signalkaskaden führte nur zu einer geringen Inhibition der ERK Phosphorylierung und c-myc Expression unter konstitutiven Bedingungen, während eine Stimulation durch bFGF zu einer deutlichen Aktivierung von ERK und Akt führte, die wiederum merklich durch BGJ398 gehemmt werden konnte. Die FGFR Blockade blieb ohne Effekt auf die konstitutive Motilität der Zellen. Konditioniertes Medium von Tumorzellen führte zu einer signifikanten Induktion der Motilität von HSCs, die jedoch durch FGFR Blockade nicht gehemmt werden konnte. FGFR Inhibition hatte keinen Einfluss auf die konstitutive und DFX-induzierte VEGF-A Expression auf mRNA Ebene. Jedoch wurde die Expression von PDGF-B durch BGJ398 induziert. Eine bFGF Expression in HSCs konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in HSCs durch die FGFR Blockade mit BGJ398 *in vitro* das Zellwachstum und pro-onkogene Signalwege, jedoch nicht die Rekrutierung im Tumorzell-assoziierten Mikromilieu beeinflusst werden kann.

#### **4.6. Beeinflussung des Tumorwachstums in Tiermodellen**

Um die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse *in vivo* verifizieren zu können, wurde zunächst ein xenogenes subkutanen Mausmodell (Huh-7) verwendet. Die Behandlung erfolgte entweder niedrig dosiert, täglich (5 mg/kg Körpergewicht) oder dreimal wöchentlich (jeweils 25 mg/kg Körpergewicht). Beide Therapiestrategien führten zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums, zu erkennen durch das Tumolvolumen und das Tumorgewicht, wobei das tägliche Konzept einen besseren Effekt zeigte (Abb. 2A, B). Ein nachfolgendes syngenes subkutanen Mausmodell (Hepa129) verifizierte die Wachstumshemmung durch die tägliche Therapie (5mg/kg) (Abb. 2C, D). Jedoch zeigte sich im syngenem Modell bereits, dass der Effekt auf das Tumorwachstum deutlich weniger ausgeprägt war, als dies vom xenogenem Modell angenommen werden durfte.

In der Zusammenschau ist jedoch eine niedrig dosierte, tägliche FGFR Blockade mit BGJ398 als effektiv in den verwendeten subkutanen HCC Tumormodellen anzusehen.



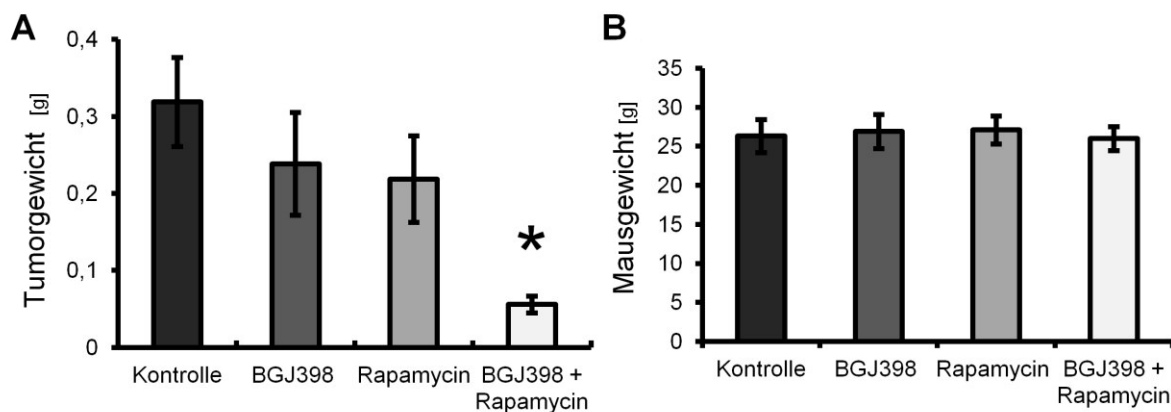
**Abb. 2:** Ergebnisse der subkutanen Mausmodelle: **A,B** Huh-7: Wachstumskurve und Tumorendgewicht: signifikante Hemmung des Tumorwachstums in beiden Behandlungsgruppen mit besserem Ergebnis in der niedrig dosierten täglichen Dosis (\*,# $P < 0.05$ ). **C,D** Hepa129: Wachstumskurve und Tumorendgewicht: signifikante Inhibition des Wachstums (\* $P < 0.05$ ).

#### 4.7. Kombinationstherapie der FGFR Blockade mit mTOR Hemmung *in vitro* und *in vivo*

Aufgrund der Bedeutung des Mikromilieus, welches für die Entwicklung und Progression des HCCs eine entscheidende Rolle spielt, verifizierten wir unsere Ergebnisse in einem orthotopen, syngenem Mausmodell (Hepa129). Durch die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen, die einen guten Effekt der Blockade des FGFR auf Tumorzellen und ECs, jedoch wenig Einfluss auf HSCs und VSMCs nachgewiesen hatten, entschieden wir uns für eine tägliche Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem BGJ398 (5mg/kg) und Rapamycin (0,2mg/kg). Diese Entscheidung basiert auf vorangegangenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe, die einen deutlichen Effekt der mTOR Blockade auf die Rekrutierung von

Perizyten (VSMCs) nachweisen konnte (35). Hinsichtlich der HSCs wurden zunächst die *in vitro* Experimente erweitert. Dabei beobachteten wir eine signifikante Reduktion des Wachstums und der Motilität der HSCs durch Kombination von BGJ398 mit dem mTOR Hemmer Rapamycin. Interessanterweise führte Rapamycin in HSCs, wie auch in Tumorzellen, zu einer Aktivierung des Akt Signalweges, die nicht durch BGJ398 beeinflussbar ist. In Tumorzellen konnte die Rapamycin-induzierte Akt Phosphorylierung jedoch durch FGFR Blockade gehemmt werden. Diesbezüglich sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig.

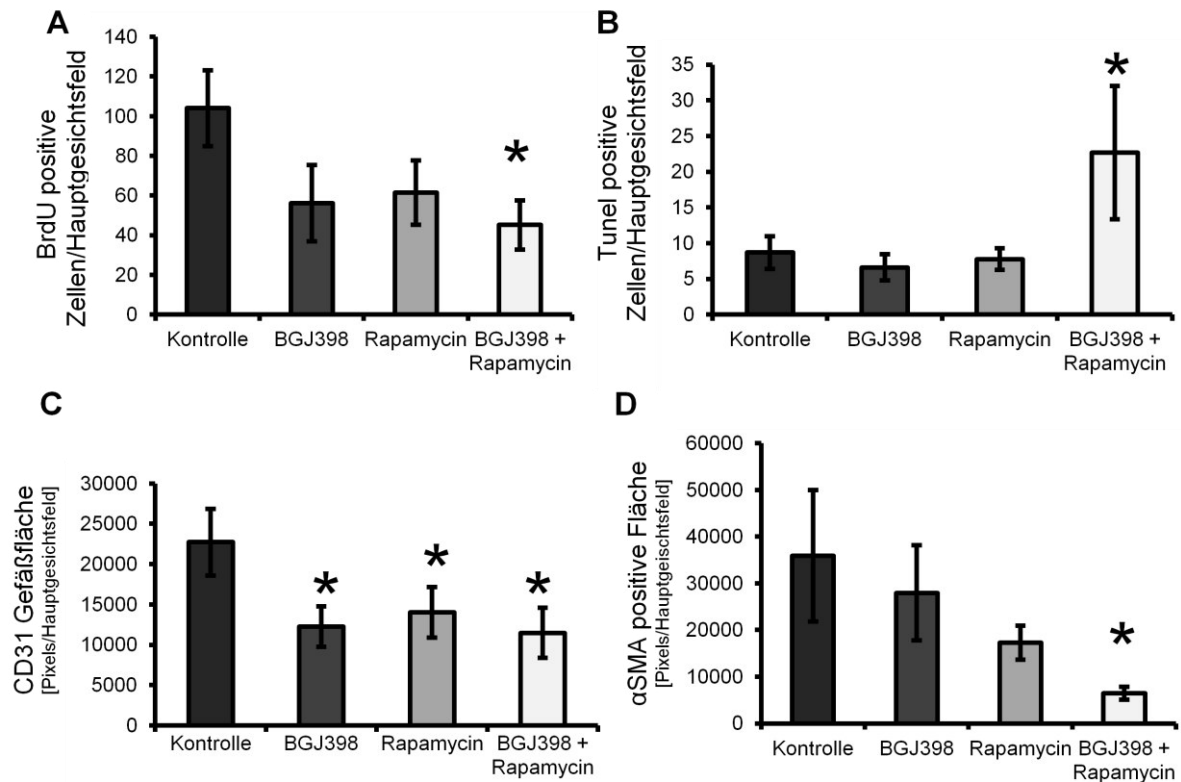
Im orthotopen Tumormodell zeigte die alleinige Behandlung mit BGJ398 oder Rapamycin nur eine geringe Reduktion des Tumorgewichtes, die kein Signifikanzniveau erreichte. Die Kombination beider Wirkstoffe hemmte das Tumorgewicht signifikant (Abb. 3A). Durch die Behandlung wurden keine toxischen Effekte bei den Tieren beobachtet (kein Unterschied hinsichtlich des finalen Tiergewichts; Abb. 3B).



**Abb. 3:** **A** Ergebnis des orthotopen, syngenem Mausmodells (Hepa129): Reduzierung des Tumorgewichtes in Einzeldosen und signifikante Hemmung in der Kombinationstherapie (\* $P < 0.05$ ). **B** Gleiches Tiergewicht in allen Behandlungsgruppen.

Nachfolgende immunhistochemische Analysen zeigten eine Hemmung der Tumorzellproliferation anhand einer signifikant verringerten Anzahl an BrdU-positiven Zellen bei der Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4A). Zur Bestimmung der Apoptoserate der Tumorzellen konnte in der Tunel-Färbung eine signifikant erhöhte

Anzahl an apoptotischen Zellen in der Kombinationsgruppe festgestellt werden (Abb. 4B). Eine Bestimmung der Tumervaskularisierung mittels CD31-Färbung ergab eine verminderte Blutgefäßfläche in allen Behandlungsgruppen, ohne Steigerung durch kombinierte FGFR/mTOR Blockade (Abb. 4C). Die  $\alpha$ SMA-positive Fläche, ein Marker für VSMCs und HSCs, war in den Tumoren mit BGJ398 und mTOR deutlich vermindert (Abb. 4D).



**Abb. 4:** Immunhistochemische Ergebnisse des orthotopen, syngenem Mausmodells: **A** Signifikante Hemmung der BrdU-positiven Zellen (Tumorzellproliferation) in der Kombinationsgruppe ( $*P < 0.05$ ). **B** In der TUNEL-Färbung signifikant erhöhte Apoptoserate in der Kombinationsgruppe ( $*P < 0.05$ ). **C** In allen Behandlungsgruppen signifikant verringerte Blutgefäßfläche in der CD31-Färbung ( $*P < 0.05$ ). **D** Perizyten werden in der Kombinationsgruppe signifikant reduziert ( $*P < 0.05$ ).

Zusammenfassend lässt sich eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums durch Effekte auf Perizyten, Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose bedingt durch die Kombinationsbehandlung mit FGFR und mTOR Blockade *in vivo* konstatieren.

## 5. Diskussion

Die Bedeutung des FGF/FGFR Systems für die Tumorentwicklung wird seit Jahren intensiv untersucht und ist mittlerweile gut belegt (19; 20; 21). Bezüglich des HCCs beschrieben Gauglhofer *et al.*, dass in 80% der untersuchten HCC Fälle zumindest ein Mitglied der FGF8 Subgruppe und/oder die entsprechenden Rezeptoren (FGFR2-4) überexprimiert seien (47). In einer weiteren Arbeit wurde zum einen die Heraufregulation von FGFR4 im HCC sowie die Reduktion des Tumorwachstums durch spezifische Blockade dieses Rezeptors in präklinischen Versuchen veranschaulicht (48). Ebenso zeigte eine Phase II-Studie mit dem VEGFR/FGFR Rezeptor Brivanib initial vielversprechende Ergebnisse bei Patienten, die mit dem Multityrosinkinase Inhibitor Sorafenib vorbehandelt worden waren. In der nachfolgenden Phase III-Studie konnte der primäre Endpunkt der Gesamtüberlebensrate jedoch nicht erreicht werden (5; 49). Gleichwohl wird das FGFR System weiterhin intensiv als „Target“ zur Behandlung des HCCs untersucht.

In unserer Studie konnten wir eine verminderte Aktivierung von onkogenen Signalwegen sowie eine Hemmung der Motilität in HCC Tumorzelllinien und Endothelzellen nachweisen. Zudem zeigte eine niedrig dosierte, tägliche Therapie mit BGJ398 *in vivo* die besten Ergebnisse. Durch Dosissteigerung/Bolusapplikation konnte keine Verbesserung der anti-tumoralen Aktivität erreicht werden. Unsere Ergebnisse zeigen dennoch, dass das Konzept der FGFR Blockade mit BGJ398 beim hepatozellulären Karzinom sehr erfolgsversprechend sein kann und weiterer präklinischer und klinischer Untersuchungen bedarf.

Bei der Entstehung und Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle, so dass anti-angiogene Therapieansätze wirksam sein könnten (4; 50). Diesbezüglich zeigen unsere Ergebnisse, dass die VEGF-A und PDGF-B Sekretion aus Tumorzellen durch FGFR Inhibition vermindert wird. Einen weiteren wichtigen Punkt unserer *in vitro* Ergebnisse stellt die verminderte Expression von c-myc durch BGJ398 dar. C-myc spielt sowohl bei der Tumorangiogenese (51) als auch bei der Rezidiventwicklung beim HCC eine wichtige Rolle (52). Schließlich führt die FGFR Blockade zu einer verminderten

konstitutiven VEGF-A und vor allem Tie2 Expression in ECs. Die verminderte Expression des Angiopoietinrezeptors Tie2, der mit einer Resistenz gegen anti-angiogene Therapieansätze assoziiert ist, legt nahe, dass durch FGFR Blockade hier eine Verbesserung erreicht werden könnte (43; 44). Nach unseren Kenntnissen wurde dieser Zusammenhang der Expression von Tie2 mit FGFR in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Stromazellen und das lokale Mikromilieu sind von besonderer Bedeutung für das Tumorstadium im HCC (19; 53). Unsere Ergebnisse konnten nur eine geringe Wirkung der FGFR Blockade auf VSMCs und HSCs zeigen, so dass nur von einem geringen Effekt von BGJ398 auf Perizyten auszugehen ist. Um diese therapeutische Lücke zu schließen, führten wir eine Kombinationsbehandlung mit BGJ398 und dem mTOR Inhibitor Rapamycin durch. Dieser Ansatz basiert auf vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die verminderte Rekrutierung von VSMCs durch mTOR Blockade zeigen (35). Zudem konnten wir anhand zusätzlicher Untersuchungen mit HSCs verstärkte anti-proliferative und anti-migratorische Effekte durch kombinierte mTOR/FGFR Hemmung zeigen. Letztendlich zeigte die Kombinationstherapie im orthotopen Mausmodell eine verbesserte Wirkung, die durch die Monotherapien alleine nicht erreicht werden konnte. Diese wird zudem durch die verminderte Expression des Perizytenmarkers  $\alpha$ SMA in der Kombinationsgruppe unterstrichen, die ebenfalls auf einen zusätzlichen Nutzen der mTOR Inhibition vermittelten Perizytenblockade hinweist. Das fehlende Ansprechen der FGFR Blockade auf die Rekrutierung von Perizyten könnte zudem einen weiteren Grund für das Scheitern der Studien mit neuen, anti-FGFR-basierten „small molecule“ Inhibitoren bei der Therapie des HCCs darstellen. Unsere Ergebnisse unterstreichen auch die Bedeutung des lokalen Mikromilieus und damit die Verwendung orthotoper, syngener Tumormodelle für die Evaluation neuer Therapiestrategien (53; 54). Zusammenfassend zeigen die gewonnenen Resultate, dass die Kombination von FGFR und mTOR Hemmern die Wirksamkeit der FGFR Blockade deutlich verbessern kann.

Die vorliegende Studie hat dennoch gewisse Limitationen. Für unsere *in vivo* Untersuchungen nutzten wir gesunde, 8 Wochen alte Mäuse. Da das HCC jedoch vornehmlich auf dem Boden einer Leberzirrhose entsteht, fehlt hier die zugrundeliegende Präkanzerose (2). Eine eingeschränkte Leberfunktion kann sowohl die Dosierung als auch die Art und Dauer der Behandlung entscheidend beeinflussen. Entsprechend sind unsere Ergebnisse diesbezüglich nur eingeschränkt übertragbar. Zudem führten wir die *in vivo* Versuchsreihen jeweils nur mit einer humanen und einer murinen Tumorzelllinie durch. Damit könnte die genetische Diversität des HCCs nur unzureichend abgebildet sein, obgleich *in vitro* verschiedene weitere Zelllinien verwendet wurden. Eine sinnvolle Ergänzung wäre die Verwendung genetisch modifizierter Mäuse, die ein HCC spontan entwickeln. Allerdings sind diese Modelle aufgrund ihrer genetischen Uniformität durchaus kritisch zu sehen. Zudem ist ihre Verwendung/Verfügbarkeit durch die Zucht, die genetische Charakterisierung und engmaschiges „Screening“ der Tiere notwendig macht, sehr aufwendig (55; 56). Eine Validierung unserer Ergebnisse in den angeführten Modellen könnte jedoch weitere wichtige Erkenntnisse erbringen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass FGFR Inhibition wirksam gegen Tumorzellen und Endothelzellen im HCC ist, während Perizyten (VSMCs und HSCs) vor allem durch mTOR Blockade beeinflusst werden. Die kombinierte Therapie durch Blockade von FGFR und mTOR stellt möglicherweise einen interessanten und neuen Ansatz bei der Therapie des HCCs dar.

## 6. Zusammenfassung der Arbeit

### Einleitung und Zielsetzung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt eine Tumorentität dar, die zu den führenden krebsbedingten Todesursachen zählt. Trotz intensiver Forschung blieben bisherige Versuche systemischer Therapien allerdings weitgehend erfolglos. Ziel unserer Untersuchung war die Analyse der „fibroblast growth factor“ Rezeptor (FGFR) Blockade mit dem „small molecule“ Inhibitor BGJ398 auf Tumorzellen und Stromazellen sowie in Kombination mit einem mTOR-Inhibitor im HCC Modell.

### Methoden

Für unsere Versuche verwendeten wir humane (Huh-7 und HepG2) und murine (Hepa129) Tumorzellen, Endothelzellen (ECs), Perizyten (VSMCs) sowie hepatische Sternzellen (HSCs). Die Effekte der FGFR Blockade mit BGJ398 bezüglich Wachstum, Migration, Signalwegen und angiogenen Markern wurde *in vitro* untersucht. *In vivo* wurden subkutane (xeno- und syngen) und orthotope (syngen) Mausmodelle zur Evaluation der FGFR bzw. FGFR/mTOR Blockade eingesetzt.

### Ergebnisse

*In vitro* führte die FGFR Blockade zu einer signifikanten Hemmung von Tumorzellwachstums, Migration sowie pro-onkogener Signalwege (Akt, ERK, c-myc) in Tumorzellen. FGFR Blockade verminderte Rekrutierung und Aktivierung angiogener Signalwege in Endothelzellen. Auf VSMCs und HSCs ließen sich nur geringe Effekte durch eine alleinige Inhibition mit BGJ398 nachweisen, während in Kombination mit einem mTOR Hemmer diese signifikant verbesserte. *In vivo* zeigte die tägliche Behandlung mit BGJ398 (5mg/kg) eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums in subkutanen Modellen. Im orthotopen Modell führte die kombinierte FGFR/mTOR Blockade zu einem verminderten Tumorzellwachstum. Immunhistochemisch bestätigte sich dies durch eine Reduktion der Tumorzellproliferation (BrdU), der Gefäßdichte (CD31), der Perizyten ( $\alpha$ SMA) und einer erhöhten Apoptoserate (Tunel).

## **Schlussfolgerung**

Die FGFR Blockade mit BGJ398 hat signifikante Effekte auf HCC Tumorzellen und Endothelzellen, während Perizyten und hepatische Sternzellen vor allem durch mTOR Inhibition beeinflusst werden. Daher könnte eine kombinierte Therapie mit FGFR und mTOR Hemmung einen interessanten Ansatz in der Behandlung des HCCs darstellen.

## 7. Abkürzungen

$\alpha$ SMA	<i>engl.</i> : alpha smooth muscle antigen
CM	<i>engl.</i> : conditioned medium
DFX	Deferroxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	<i>engl.</i> : endothelial cell
ERK	<i>engl.</i> : extracellular-signal regulated kinase
FCS	<i>engl.</i> : fetal calf serum
FGF	<i>engl.</i> : fibroblast growth factor
FGFR	<i>engl.</i> : fibroblast growth factor receptor
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HSC	<i>engl.</i> : hepatic stellate cell
MAPK	<i>engl.</i> : mitogen-activated protein kinase
mTOR	<i>engl.</i> : mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PDGF	<i>engl.</i> : platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RNA	<i>engl.</i> : ribonucleid acid
RT-PCR	<i>engl.</i> : real time polymerase chain reaction
VEGF	<i>engl.</i> : vascular endothelial growth factor
VSMC	<i>engl.</i> : vascular smooth muscle cell

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61(2):69-90., 2011.
2. **El-Serag HB.** Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 142(6):1264-1273 e1261, 2012.
3. **Bruix J, Sherman M.** Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology.* 53(3):1020-1022., 2011.
4. **Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al.** Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 10(1):25-34, 2009.
5. **Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, et al.** Brivanib Versus Placebo in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (Hcc) Who Failed or Were Intolerant to Sorafenib: Results from the Phase 3 Brisk-Ps Study. *J Hepatol.* 56:S549, 2012.
6. **Lee JK, Abou-Alfa GK.** An update on clinical trials in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 47 Suppl:S16-9, 2013.
7. **Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK.** HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.* 8(5):292-301, 2011.
8. **Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M.** Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene.* 33(14):1743-54, 2014.
9. **Van den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Hoyer-Hansen G, et al.** The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res.* 73(7):2031-2043, 2013.
10. **Höpfner M, Schuppan D, Scherübl H.** Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol.* 14(1):1-14., 2008.
11. **Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Yamazaki M, Kikukawa M, Tsujinoue H, et al.** Vascular endothelial growth factor tightly regulates in vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology.* 28:1489-1496., 1998.
12. **Kaseb AO, Hanbali A, Cotant M, Hassan MM, Wollner I, Philip PA.** Vascular endothelial growth factor in the management of hepatocellular carcinoma: a review of literature. *Cancer.* 115(21):4895-906, 2009.
13. **Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST.** High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol.* 14(6):1835-1845, 2007.
14. **Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, et al.** Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 4(2):220-226, 2005.

15. **Lieu C, Heymach J, Overman M, Tran H, Kopetz S.** Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clin Cancer Res.* 17(19):6130-6139, 2011.
16. **Harimoto N, Taguchi K, Shirabe K, Adachi E, Sakaguchi Y, Toh Y, et al.** The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 78(5-6):361-368, 2010.
17. **Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J.** Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg.* 182(3):298-304, 2001.
18. **Beenken A, Mohammadi M.** The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 8(3):235-53, 2009.
19. **Turner N, Grose R.** Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(2):116-129, 2010.
20. **Brooks AN, Kilgour E, Smith PD.** Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res.* 18(7):1855-62, 2012.
21. **Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC.** Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov.* 3(3):264-279, 2013.
22. **Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, et al.** AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell.* 11(1):83-95, 2007.
23. **Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D.** Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell.* 8(4):299-309, 2005.
24. **Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB.** Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 18(1):26-45, 1997.
25. **Lin N, Chen S, Pan W, Xu L, Hu K, Xu R.** NP603, a novel and potent inhibitor of FGFR1 tyrosine kinase, inhibits hepatic stellate cell proliferation and ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301(2):C469-477, 2011.
26. **Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, Stamm C, et al.** Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem.* 54(20):7066-7083, 2011.
27. **Wöhrle S, Weiss A, Ito M, Kauffmann A, Murakami M, Jagani Z, et al.** Fibroblast growth factor receptors as novel therapeutic targets in SNF5-deleted malignant rhabdoid tumors. *PLoS One.* 8(10):e77652, 2013.

28. **Göke F, Göke A, von Mässenhausen A, Franzen A, Sharma R, Kirsten R, et al.** Fibroblast growth factor receptor 1 as a putative therapy target in colorectal cancer. *Digestion*. 88(3):172-81, 2013.
29. **Konecny GE, Kolarova T, O'Brien NA, Winterhoff B, Yang G, Qi J, Qi Z, et al.** Activity of the fibroblast growth factor receptor inhibitors dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in human endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 12(5):632-42, 2013.
30. **Liang G, Chen G, Wei X, Zhao Y, Li X.** Small molecule inhibition of fibroblast growth factor receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 24(5):467-75, 2013.
31. **Dufour M, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O.** Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cancer Therapy: Lessons from Past and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 3(2):2478-500, 2011.
32. **Matter MS, Decaens T, Andersen JB, Thorgeirsson SS.** Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: Current state and future trends. *J Hepatol*. 2013.
33. **Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al.** Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* . 135(6): 1972-83, 1983 e1-11, 2008.
34. **Huynh H, Chow KH, Soo KC, Toh HC, Choo SP, Foo KF, et al.** RAD001 (everolimus) inhibits tumour growth in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*. 13(7): 1371-80, 2009.
35. **Lang SA, Moser C, Fichnter-Feigl S, Schachtschneider P, Hellerbrand C, Schmitz V, et al.** Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 49(2):523-532, 2009.
36. **Piguet AC, Majumder S, Maheshwari U, Manjunathan R, Saran U, Chatterjee S, et al.** Everolimus is a potent inhibitor of activated hepatic stellate cell functions in vitro and in vivo, while demonstrating anti-angiogenic activities. *Clin Sci (Lond)*. 126(11): 775-84, 2014.
37. **Zhu AX, Kudo M, Assenat E, Cattan S, Kang YK, Lim HY et al.** Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial. *JAMA*. 312(1):57-67, 2014.
38. **Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, et al.** Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res*. 63(12):3370-7, 2003.
39. **Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, et al.** MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*. 431(7012):1112-7, 2004.
40. **Coulouarn C, Clément B.** Stellate cells and the development of liver cancer: Therapeutic potential of targeting the stroma. *J Hepatol*. 60(6):1306-9., 2014.
41. **Carloni V, Luong TV, Rombouts K.** Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: more complicated than ever. *Liver Int*. 34(6):834-43, 2014.

42. **Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, et al.** TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis. *Hepatology*. 57(4):1416-25, 2013.
43. **Daly C, Eichten A, Castanaro C, Pasnikowski E, Adler A, Lalani AS, et al.** Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Res*. 73(1):108-118, 2013.
44. **Martin V, Xu J, Pabbisetty SK, Alonso MM, Liu D, Lee OH, et al.** Tie2-mediated multidrug resistance in malignant gliomas is associated with upregulation of ABC transporters. *Oncogene*. 28(24):2358-2363, 2009.
45. **Yu G, Jing Y, Kou X, Ye F, Gao L, Fan Q, et al.** Hepatic stellate cells secreted hepatocyte growth factor contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 8(9):e73312, 2013.
46. **Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY.** **Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer.** Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*. 123(5):1902-1910, 2013.
47. **Gauglhofer C, Sagmeister S, Schrottmaier W, Fischer C, Rodgarkia-Dara C, Mohr T, et al.** Up-regulation of the fibroblast growth factor 8 subfamily in human hepatocellular carcinoma for cell survival and neoangiogenesis. *Hepatology*. 53(3):854-864, 2011.
48. **French DM, Lin BC, Wang M, Adams C, Shek T, Hotzel K, et al.** Targeting FGFR4 inhibits hepatocellular carcinoma in preclinical mouse models. *PLoS One*. 7(5):e36713, 2012.
49. **Finn RS, Kang YK, Mulcahy M, Polite BN, Lim HY, Walters I, et al.** Phase II, open-label study of brivanib as second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 18(7):2090-2098, 2012.
50. **Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al.** Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 359(4):378-390., 2008.
51. **Chen C, Cai SX, Wang GH, Cao XN, Yang X, Luo XL, et al.** c-Myc enhances colon cancer cell-mediated angiogenesis through the regulation of HIF-1 alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 430(2):505-511, 2013.
52. **Cui J, Dong BW, Liang P, Yu XL, Yu DJ.** Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol*. 10(10):1533-1536, 2004.
53. **Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM.** Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 144(3):512-527, 2013.
54. **Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A.** Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol*. 170(3):793-804, 2007.

55. **Ringelhan M, Reisinger F, Yuan D, Weber A, Heikenwalder M.** Modeling human liver cancer heterogeneity: virally induced transgenic models and mouse genetic models of chronic liver inflammation. *Curr Protoc Pharmacol.* 67:14.31.1-14.31.17, 2014.

56. **Bakiri L, Wagner EF.** Mouse models for liver cancer. *Mol Oncol.* 7(2):206-23, 2013.

## 9. Anhang

Lysepuffer für Westernblot:

795µl RIPA-B-Puffer
100µl 10xProteininhibitor
5µl 0,1M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
100µl 20mM PMSF

RIPA-B-Puffer	5ml Triton X-100, 15ml NaCl 5M, 5ml EDTA 0,5M, 50ml 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O auf 500ml Aqua dest.
10xProteininhibitor	5 Tabletten "complete mini" auf 7,5ml H <sub>2</sub> O (Konservierung bei -20°C)
0,1M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	18,39mg Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> auf 1 ml Aqua dest.
20mM PMSF	69,6mg Phenylethylsulfonylfluorid in 20ml Isopropanol (Konservierung bei -20°C)
Aqua dest.	Eigenes Labor
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropranolol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PMSF	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Proteininhibitor	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

## 10. Lebenslauf

### Persönliches

Name Tobias Philipp Scheller  
Geburtsdatum und –ort 10.09.1986 in Würzburg  
Familienstand ledig

### Aktuelle Tätigkeit

seit 04/2014 Assistenzarzt am Klinikum Kempten in der Abteilung für  
Orthopädie, Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

### Forschung

- Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Tübingen 2014: „mTOR Inhibition verbessert die Effektivität der FGFR Blockade im HCC Modell“; **Scheller T.**, Hellerbrand C., Schmidt K., Geissler E.K., Schlitt H.J., Lang S.A.
- Posterbeitrag Deutscher Krebskongress, Berlin 2012: „Inhibition of FGFR impairs angiogenic signaling in human HCC cell lines and stromal cells“; **Scheller T.**, Moser C., Hellerbrand C., Mycielska M., Schnitzbauer A., Wagner C., Scheiffert E., Geissler E.K., Schlitt H.J., Lang S.A.
- Posterbeitrag/Abstract Annual Meeting American Association for Cancer Research (AACR), Chicago, Illinois, USA 2012: “Targeting FGFR system in a model of HCC”; Lang S.A., **Scheller T.**, Moser C., Mycielska M., Hellerbrand C., Schlitt H.J., Geissler E.K.
- Posterbeitrag Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Regensburg, 2011: „Targeting FGFR hemmt Motilität und Signaltransduktion in Tumor- und Stromazellen im HCC Modell“; **Scheller T.**, Moser C., Hellerbrand C., Mycielska M., Schnitzbauer A., Wagner C., Scheiffert E., Geissler E.K., Schlitt H.J., Lang S.A.
- Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Regensburg 2011: „Inhibition von FGFR hemmt Motilität und angiogene Signaltransduktion von Tumor- und Endothelzellen im HCC Modell“; **Scheller T.**, Moser C., Wagner C., Scheiffert E., Geissler E.K., Schlitt H.J., Lang S.A.
- Posterbeitrag Chirurgische Forschungstage, Dresden 2011: „Targeting FGFR impairs motility and oncogenic signaling in human HCC cell lines and stromal cells“; **Scheller T.**, Moser C., Mycielska M., Hellerbrand C., Geissler E.K., Schlitt H.J., Lang S.A.

### Akademische Ausbildung

10/2009 – 11/2013 Klinischer Abschnitt Universität Regensburg  
10/2007 – 09/2009 Vorklinischer Abschnitt Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### Praktisches Jahr

04/2013 – 07/2013	Chirurgie, Uniklinikum Regensburg
01/2013 – 04/2013	Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
11/2012 – 12/2012	Orthopädie, Bruderholzspital, Basel, Schweiz
08/2012 – 10/2012	Orthopädie, Asklepios Klinik Bad Abbach, Regensburg

### Famulaturen

03/2012	Chirurgie, Diocesan Hospital Litembo, Mbinga, Tansania
09/2011	Radiologie, Marienkrankenhaus Hamburg
03/2011	Notaufnahme, Joondalup Health Campus, Perth, Australien
03/2010	Kardiologie, Klinikum Traunstein
02/2010	Unfallchirurgie, Univeristätsklinikum Würzburg

### Zivildienst

09/2006 – 06/2007	Pflegehelfer, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
-------------------	--

### Schulische Ausbildung

09/1997 – 06/2006	Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg
08/2003 – 06/2004	Adair Co. High School, Columbia, Kentucky, USA
09/1993 – 08/1997	Grundschule Lengfeld, Würzburg

### Kenntnisse/Interessen

Sprachen	Deutsch (Muttersprache), Latein (Abitur), Englisch (verhandlungssicher), Spanisch (Anfänger)
Hobbies	Triathlon, Laufen, Rennrad, Berge (Winter wie Sommer), Volleyball, Tennis, Lesen, Reisen,...

## **11. Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit begleitet und in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an meinen Betreuer und Doktorvater PD Dr. Sven A. Lang für das Überlassen dieses interessanten Themas, die hervorragende Betreuung während der ganzen Zeit und die Möglichkeit bei verschiedenen Kongressen die jeweils aktuellsten Ergebnisse der Arbeit präsentieren zu dürfen.

Für die Möglichkeit der Durchführung der verschiedenen Versuche bedanke ich mich bei Prof. Edward K. Geissler, PhD, dem Leiter der experimentellen Chirurgie, sowie Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Chirurgie.

Ohne die ständige Hilfe und Unterstützung der technischen Assistentinnen Christine Wagner, Eva Scheiffert und Julia Redekopf bei den Versuchsdurchführungen wäre ich das eine oder andere Mal nicht weitergekommen: ein herzliches Dankeschön dafür.

Zuletzt geht ein spezieller Dank an meine Eltern, die mich seit jeher in all meinen Schritten begleitet, unterstützt und immer wieder ermutigt haben.

## **12. Abdruck der Publikation**

Im Anschluss finden Sie die Originalpublikation, auf deren Grundlage diese Zusammenfassung verfasst wurde.

Keywords: FGFR; HCC; angiogenesis; mTOR; HSC

# mTOR inhibition improves fibroblast growth factor receptor targeting in hepatocellular carcinoma

T Scheller<sup>1</sup>, C Hellerbrand<sup>2</sup>, C Moser<sup>1</sup>, K Schmidt<sup>1</sup>, A Kroemer<sup>1</sup>, S M Brunner<sup>1</sup>, H J Schlitt<sup>1</sup>, E K Geissler<sup>1</sup> and S A Lang<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, University Hospital Regensburg, University of Regensburg Medical Center, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93053 Regensburg, Germany and <sup>2</sup>Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, University of Regensburg Medical Center, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

**Background:** Systemic therapy has proven only marginal effects in hepatocellular carcinoma (HCC) so far. The aim of this study was to evaluate the effect of targeting fibroblast growth factor receptor (FGFR) on tumour and stromal cells in HCC models.

**Methods:** Human and murine HCC cells, endothelial cells (ECs), vascular smooth muscle cells (VSMCs), hepatic stellate cells (HSCs), human HCC samples, FGFR inhibitor BGJ398 and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor rapamycin were used. Effects on growth, motility, signalling and angiogenic markers were determined. *In vivo* subcutaneous and syngeneic orthotopic tumour models were used.

**Results:** In tumour cells and ECs, targeting FGFR showed significant inhibitory effects on signalling and motility. Minor effects of FGFR inhibition were observed on VSMCs and HSCs, which were significantly enhanced by combining FGFR and mTOR blockade. *In vivo* daily (5 mg kg<sup>-1</sup>) treatment with BGJ398 led to a significant growth inhibition in subcutaneous tumour models, but only a combination of FGFR and mTOR blockade impaired tumour growth in the orthotopic model. This was paralleled by reduced tumour cell proliferation, vascularisation, pericytes and increased apoptosis.

**Conclusions:** Targeting FGFR with BGJ398 affects tumour cells and ECs, whereas only a combination with mTOR inhibition impairs recruitment of VSMCs and HSCs. Therefore, this study provides evidence for combined FGFR/mTOR inhibition in HCC.

Liver cancer is the sixth most commonly diagnosed cancer worldwide, and hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for the vast majority of cases (Jemal *et al*, 2011). Hepatocellular carcinoma almost exclusively develops upon chronic liver diseases such as viral hepatitis, alcohol abuse and nonalcoholic steatohepatitis. Surgery is the only curative treatment option, but owing to advanced stages and the underlying disease, few patients are eligible for surgical resection or liver transplantation (Bruix and Sherman, 2011). Therefore, novel therapeutic options are urgently needed.

So far, systemic therapy has been disappointing in HCC. Only the multityrosine kinase inhibitor sorafenib, acting via vascular

endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) and Raf kinases to inhibit angiogenesis, shows a modest benefit in clinical trials (Llovet *et al*, 2008). Nevertheless, therapies targeting high vascularisation, a common feature of HCC, remain promising (Zhu *et al*, 2011). In general, tumour angiogenesis is driven by certain factors such as VEGFs, platelet-derived growth factors (PDGFs) and fibroblast growth factors (FGFs) secreted from tumour and stromal cells (Zhu *et al*, 2011; Casazza *et al*, 2013). With HCC, high serum VEGF levels are associated with advanced or metastatic stages and poor survival after locoregional therapy (Yao *et al*, 2005; Poon *et al*, 2007). Furthermore, acidic FGF (aFGF, FGF-1) and basic FGF (bFGF, FGF-2) are involved in angiogenesis

\*Correspondence: Dr SA Lang; E-mail: sven.lang@ukr.de

Revised 21 November 2014; accepted 28 November 2014

© 2015 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/15

via effects on endothelial cell (EC) activation and recruitment (Lieu *et al.*, 2011). In particular, increased levels of bFGF are detectable in HCC patients and the expression correlates with the microvessel density of the tumour and recurrence after resection (Poon *et al.*, 2001; Harimoto *et al.*, 2010). Therefore, angiogenesis is a crucial part of HCC development and progression.

The FGF/FGFR system consisting of four receptors (FGFR1–4) and 19 ligands (FGFs) is important for carcinogenesis. On a functional level, activation of intracellular cascades (MAPK/ERK or PI3K/Akt) upon ligand binding to FGFRs affects various cancer cell behaviours (Dieci *et al.*, 2013). In particular, proliferation is mainly mediated via MAPK/ERK signalling, whereas cancer cell survival is affected by PI3K/Akt signalling. Moreover, tumour cell motility is at least, in part, influenced by both signalling pathways (Hu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). In addition, activation of the FGF/FGFR system is associated with resistance after antiangiogenic therapy (Casanovas *et al.*, 2005). Finally, the FGF/FGFR system has been implicated in recruitment of stromal cells, for example, ECs, which are important for HCC progression (Lieu *et al.*, 2011). BGJ398 is a novel orally administered pan-FGFR kinase inhibitor under investigation in clinical phase I studies (Guagnano *et al.*, 2011); this substance could offer an interesting antineoplastic approach for HCC treatment. Nonetheless, clinical studies with FGFR inhibitors have been disappointing so far. Therefore, we sought to assess alternative strategies beyond targeting ‘only’ FGFR. Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway has been associated with less differentiated tumours, bad prognosis and earlier recurrence in HCC (Matter *et al.*, 2013). In particular, treatment with mTOR inhibitors such as rapamycin has demonstrated potent antineoplastic effects, at least in part, via targeting stromal cells in various preclinical cancer models including HCC (Huynh *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2009). Therefore, targeting the mTOR pathways provides an interesting therapeutic option for HCC.

Here, we hypothesised that inhibition of FGF/FGFR signalling impairs tumour growth in HCC models via effects on cancer and stromal cells. Our results demonstrate that targeting FGFR, particularly in combination with an mTOR inhibitor, is a new and promising strategy for the treatment of HCC.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Fibroblast growth factor receptor inhibitor BGJ398 (Novartis Oncology, Basel, Switzerland) was dissolved in dimethylsulphoxide (*in vitro*) and water (*in vivo*). Rapamycin (Wyeth, Madison, NJ, USA) was dissolved in water (*in vivo*) or cell culture medium (*in vitro*). Recombinant human bFGF was purchased from R&D Systems (Wiesbaden, Germany). Antibodies against pAkt<sup>Ser473</sup>, Akt, pERK<sup>Tyr202/204</sup>, ERK, pFAK<sup>Tyr397</sup>, FAK, pPaxillin<sup>Tyr118</sup>, Paxillin, RhoA, E-cadherin, N-cadherin, c-myc (obtained from Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and PDI (obtained from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were used.

**Cell culture.** Human HCC lines (HepG2, Huh-7, Hep3B, PLC5; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), human ECs and VSMCs as representatives for vascular pericytes (both Promocell, Heidelberg, Germany) were purchased. Murine Hepa129 cells were kindly provided by Prof. Volker Schmitz (University of Bonn, Bonn, Germany). Tumour cells, ECs, VSMCs and HSCs were processed as described (Amann *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2009); conditioned media (CM) were produced as published (Lang *et al.*, 2009; Taeger *et al.*, 2011).

**Patient samples.** Tumour specimens from 10 patients who underwent resection for HCC at the Department of Surgery, University Hospital Regensburg (Regensburg, Germany) were obtained. After resection, tumour samples were excised and

immediately snap frozen. RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The study was approved by the local ethics committee at the University of Regensburg (no. 12-101-0009). Informed consent was obtained before the surgical procedure.

**Measurement of cell growth.** To evaluate effects of targeting FGFR with BGJ398, tumour cells, ECs, VSMCs and HSCs were seeded into 96-well plates ( $1-2 \times 10^3$  per well) for 24, 48 and 72 h under complete medium and serum-starved conditions (10% and 1% FCS in DMEM, respectively). Basic FGF ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) was added to serum-starved conditions to assess effects on cell growth. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) assay was used to assess cell growth. The effect of BGJ398 on tumour cell growth was also determined in a cell-counting assay (Taeger *et al.*, 2011).

**Cell motility.** Migration assays were performed using modified Boyden chambers, as described (Lang *et al.*, 2009). Briefly,  $5 \times 10^4$  cells were resuspended in 1% FCS-DMEM and seeded into  $8 \mu\text{m}$  filter pore inserts (BD, Heidelberg, Germany). Either FCS or bFGF ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) served as a chemoattractant for cancer cells. In EC, VSMC and HSC, CM from HepG2 and Huh-7, as well as bFGF ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ), was used. Migrated cells were Wright–Giemsa stained and counted in four random fields.

**Western blotting.** Western blotting was performed as described previously (Lang *et al.*, 2009). Briefly, whole-cell lysates were prepared and protein samples ( $50 \mu\text{g}$ ) were subjected to western blotting on a denaturing 10% SDS–PAGE. Membranes were probed with indicated antibodies and detected by chemiluminescence (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). To quantify results from western blotting, densitometry was performed using ImageJ (1.46r; <http://imagej.nih.gov/ij>). Expression of proteins was calculated in relation to the respective control (e.g. pAkt/Akt).

**Measurement of VEGF-A, bFGF, PDGF-B, FGFRs and Tie2 mRNA.** Total RNA was isolated, purified and  $1 \mu\text{g}$  aliquots of RNA were reverse transcribed. Primer pairs for PCR are shown as Supplementary Material. Reverse transcription–PCR was performed using the LightCycler system and Roche Fast-Start Light Cycler-Master Hybridisation Probes master mix (Roche, Mannheim, Germany). Hypoxia was chemically induced with desferrioxamine (DFX;  $100 \text{ nmol l}^{-1}$ ; Sigma, Taufkirchen, Germany) (Lang *et al.*, 2007; Gauglhofer *et al.*, 2011) and cells were incubated  $\pm$  BGJ398 ( $100 \text{ nM}$ ) for the assessment of VEGF-A, bFGF, PDGF-B and Tie2.

**Enzyme-linked immunosorbent assay for VEGF-A.** To determine changes in VEGF-A secretion, we used an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (BioSource, Nivelles, Belgium), as described (Lang *et al.*, 2009). Hepatocellular carcinoma cells were plated at 40–50% density and incubated  $\pm$  BGJ398 and stimulated with DFX for 24 h before collection of culture supernatants.

**Subcutaneous HCC models.** Experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Regensburg and the regional authorities. In addition, experiments were conducted according to ‘Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia’ published by The United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research. Huh-7 cells ( $1 \times 10^6$ ) and Hepa129 cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were subcutaneously injected into nude mice (Balb-*c*<sub>nu/nu</sub>,  $n = 6-8$  mice per group) and C3H mice ( $n = 8-9$  mice per group) (Charles River, Sulzfeld, Germany), as described (Lang *et al.*, 2009). Mice were randomised and assigned to control or treatment groups. Therapy was initiated when tumours reached a size of  $\sim 100 \text{ mm}^3$  with BGJ398 ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  per day or  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  per  $3 \times$  per week) via oral gavage. Tumour diameters were measured and volumes calculated ( $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.5$ ). The experiment was terminated on day

30 (Huh-7) or on day 14 (Hepa129). Tumours were excised and weighed.

**Orthotopic tumour model.** A total of  $5 \times 10^4$  Hepa129 cells were injected into the left liver lobe of C3H mice ( $n=6-8$  mice per group), as described (Lang *et al*, 2009). Treatment was initiated on day 7 after tumour cell implantation, with the mice receiving: (1) BGJ398  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  per day (oral gavage), (2) rapamycin  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  per day (intraperitoneally), (3) combination therapy or (4) water. Treatment was continued for 12 days. Mice were observed daily and killed when tumour-related symptoms occurred. Tumours were excised, measured and processed for immunohistochemistry at the end point (day 19).

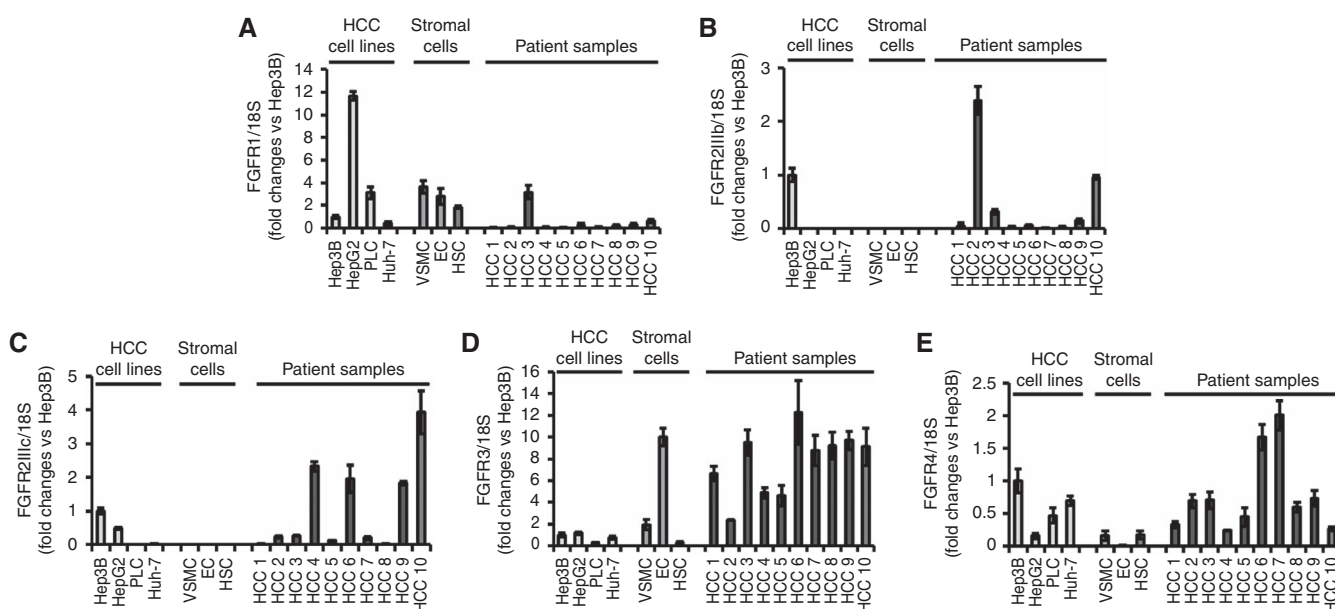
**Immunohistochemistry.** Assessment of tumour cell proliferation and apoptosis was performed as described (Lang *et al*, 2009). To determine CD31-positive vessel area and intratumoral pericytes ( $\alpha$ SMA-positive cells), frozen tissue was fixed in cold acetone and chloroform, washed with PBS and exposed to primary antibodies against CD31 (1 : 50; Pharmingen, Heidelberg, Germany) or  $\alpha$ SMA (1 : 50; Sigma), and respective secondary antibodies (Alexa Fluor 488 and 594; 1 : 200).

**Statistics.** Statistics were performed using SigmaStat (Version 3.0, San Jose, CA, USA) and GraphPadPrism (Version 6.0, La Jolla, CA, USA). Results of *in vivo* experiments were analysed for significant outliers using Grubb's test (<http://www.graphpad.com>). Tumour-associated variables in *in vivo* experiments were tested for significance using the Mann-Whitney *U*-test and ANOVA test. The two-sided Student's *t*-test was applied for analysis of *in vitro* data. Results for migration assays and PCR are shown relative to control results. Expression of FGFRs in all HCC cell lines, stromal cells and patient samples is normalised to Hep3B as this tumour cell line expresses all FGFRs. All results were confirmed in independent experiments and are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m.

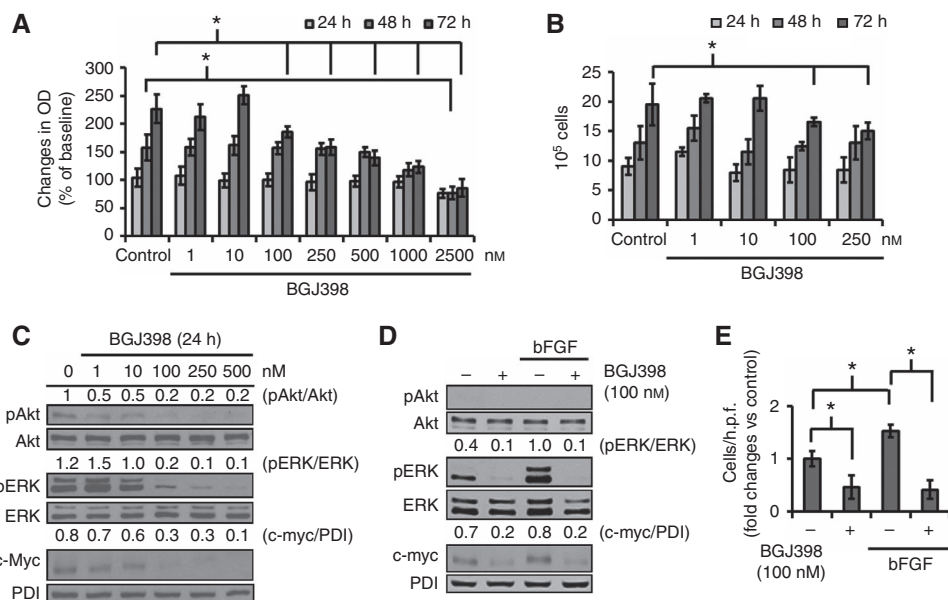
## RESULTS

**Expression of FGFR1-4 in cancer cell lines, stromal cells and patient samples.** To delineate the potential targets for BGJ398, we determined the expression of FGFRs in HCC cell lines, ECs, VSMCs, HSCs and 10 human HCC samples (named HCC1-10). Reverse transcription-PCR showed that all HCC cell lines (Huh-7, HepG2, Hep3B, PLC5) express FGFR1, FGFR3 and FGFR4. Fibroblast growth factor receptor 2IIIb was only found in Hep3B, which is in line with previously published results (Amann *et al*, 2010). Fibroblast growth factor receptor 2IIIc was detected in Hep3B and HepG2 cells and weakly in Huh-7 cells, but not in PLC5 cells (Figure 1A-E). Regarding stromal cells, no expression of FGFR2IIIb and FGFR2IIIc was found in VSMCs, ECs and HSCs, whereas FGFR1, FGFR3 and FGFR4 were detected in these cells. However, FGFR3 was only weakly expressed in HSCs and very little expression of FGFR4 was detectable in ECs (Figure 1A-E). Finally, assessment of tumour samples revealed a very heterogeneous picture. In general, all FGFRs were detectable in almost all 10 HCC samples that were used for these analyses (except FGFR1 in HCC5 and FGFR2IIIb in HCC1 and HCC7; Figure 1A-E). In conclusion, our results clearly demonstrate that FGFRs are expressed in HCC cell lines, stromal cells and also in human cancer specimens, and therefore might serve as a target for anti-FGFR-directed therapy.

**Effects of targeting FGFR with BGJ398 on tumour cells *in vitro*.** Owing to the heterogeneous expression pattern of FGFRs in HCC cell lines, we initially used Huh-7 for the assessment of BGJ398 *in vitro*. Results were subsequently confirmed in HepG2, PLC5 and Hep3B, unless otherwise indicated. First, MTT assays showed significant growth inhibition by BGJ398 starting from 100 nM after 72 h (Figure 2A;  $\text{IC}_{50}$  (48 h): 2359 nM,  $\text{IC}_{50}$  (72 h): 1124 nM). After 48 h, only the highest dose led to growth inhibition. Similar results were obtained for HepG2, PLC5 and Hep3B (Supplementary Figures 2A, 3A and 4A). Growth inhibitory effects



**Figure 1.** Expression of FGFRs in HCC cell lines, stromal cells and clinical samples. (A) Fibroblast growth factor receptor 1 expression was found in HCC cell lines, stromal cells and clinical samples. (B) Fibroblast growth factor receptor 2IIIb expression was only detected in Hep3B cells. Stromal cells did not express FGFR2IIIb, whereas all clinical samples except HCC1 did express various levels. (C) Fibroblast growth factor receptor 2IIIc was observed in three HCC cell lines (very weak in Huh-7) and all clinical samples. No expression was found in stromal cells. (D) Fibroblast growth factor receptor 3 expression was detectable in all HCC cell lines, clinical samples and stromal cells. (E) Similar FGFR4 was found in all HCC cell lines, clinical samples and stromal cells, although expression in ECs was very weak. Bars = s.e.; results are normalised to Hep3B.



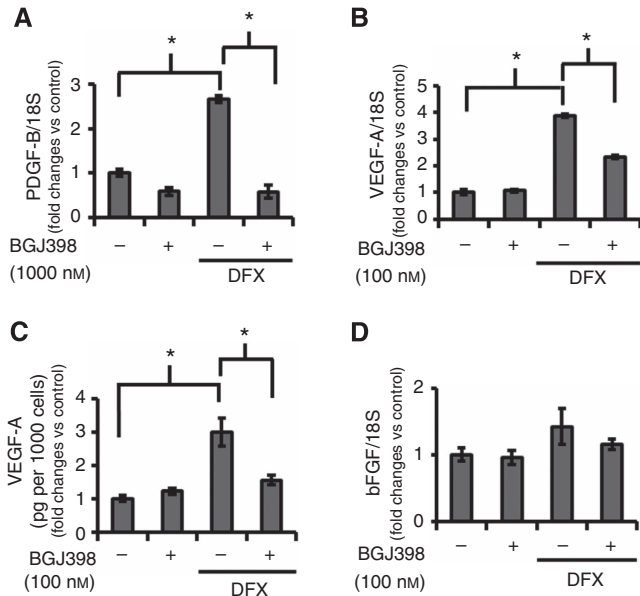
**Figure 2.** Effects of targeting FGFR with BGJ398 on cancer cells. (A) MTT assays showed impaired tumour cell growth after 48 and 72 h of treatment ( $*P < 0.05$ ). (B) Cell counting assays confirmed the MTT results ( $*P < 0.05$ ). (C) Incubation with increasing doses of BGJ398 impaired phosphorylation of ERK, Akt and diminished expression of c-myc. (D) Basic FGF led to a marked induction of ERK phosphorylation, whereas Akt remains unaffected. BGJ398 impairs ERK *in vitro*. (E) BGJ398 significantly reduced constitutive and bFGF-induced migration ( $*P < 0.05$ ).

were subsequently confirmed for Huh-7 in cell count assays (Figure 2B). Analyses of signalling intermediates by western blotting after 24 h of incubation with increasing doses of BGJ398 showed a dose-dependent inhibition of constitutive Akt, ERK phosphorylation and c-myc expression in Huh-7 (Figure 2C). Effects on ERK signalling and c-myc expression after 24 h were confirmed in HepG2, PLC5 and Hep3B, whereas constitutive Akt phosphorylation was not detectable in these cell lines (data not shown). Furthermore, incubation of cancer cell lines with BGJ398 led to the inhibition of bFGF-induced ERK phosphorylation (Figure 2D). Surprisingly, Akt phosphorylation was not increased upon bFGF incubation. This was confirmed in HepG2, PLC5 and Hep3B (Supplementary Figures 2B, 3B and 4B). Migration assays showed a significant reduction of constitutive and bFGF-induced tumour cell motility after 24 h by BGJ398 in all HCC cell line (Figure 2E, Supplementary Figures 1A, 2C, 3C and 4C), whereas effects on constitutive migration were only found in Huh-7 and Hep3B (Supplementary Figures 2C, 3C and 4C). In summary, results so far indicate that FGFR inhibition has minor effects on growth of cancer cells, but substantially impairs oncogenic signalling and tumour cell motility *in vitro*.

**Modulation of angiogenic factors by FGFR inhibition.** As angiogenesis has a crucial role in HCC, we next assessed the expression of angiogenic factors upon FGFR inhibition in HCC cell lines. Results showed a significant reduction of DFX-induced PDGF-B and VEGF-A mRNA expression upon FGFR inhibition in all HCC cell lines cells (Figure 3A and B and Supplementary Figures 2D, 2E, 3D, 3E, 4D and 4E). Enzyme-linked immunosorbent assay confirmed the significant reduction of DFX-induced VEGF-A secretion when cells were incubated for 24 h with BGJ398 (Figure 3C and Supplementary Figures 2F, 3F and 4F). However, bFGF mRNA expression was significantly reduced in HepG2, PLC5 and Hep3B cells after BGJ398 treatment, whereas Huh-7 cells showed no significant response (Figure 3D and Supplementary Figures 2G, 3G and 4G). Nonetheless, these results indicate that FGFR inhibition with BGJ398 has the potential to reduce the expression of angiogenic factors in HCC cell lines *in vitro*.

**Effects of FGFR inhibition on ECs *in vitro*.** Endothelial cells are essential for tumour growth and angiogenesis. MTT assays with BGJ398 showed significant growth inhibition after 72 h incubation with BGJ398 starting with 100 nM (Supplementary Figure 5A;  $IC_{50}$  (72 h) > 2500 nM). Incubation with bFGF did not have an effect on growth *in vitro* (Supplementary Figure 5B). Western blotting revealed a dose-dependent inhibition of constitutive ERK phosphorylation, but no apparent impact on Akt phosphorylation after 24 h of BGJ398 treatment (Supplementary Figure 5C). Migration assays exhibited a significant reduction in constitutive and bFGF-induced EC motility upon BGJ398 addition (Figure 4A). Furthermore, bFGF-induced ERK, Akt phosphorylation and constitutive c-myc expression was diminished by BGJ398 (Figure 4B). To further analyse the effects of the local microenvironment on recruitment of ECs, CM from Huh-7 and HepG2 cells was used. We chose CM from these two cell lines because of their different response to FGFR inhibition with regard to bFGF mRNA expression (Figure 3D and Supplementary Figure 2G); a previous report indicates that reduced expression of FGFR2IIIb confers more aggressive growth in HCC, and both cell lines do not express this molecule (Amann *et al*, 2010). Migration assays revealed an induction of motility that was partially impaired by targeting FGFR (Figure 4C for CM from Huh-7 and Supplementary Figure 5D for CM from HepG2). Regarding angiogenic factors, RT-PCR showed no changes in PDGF-B or bFGF mRNA expression, even upon DFX induction (data not shown); only constitutive VEGF-A expression was reduced (Supplementary Figure 5E). Finally, Tie2 mRNA was reduced upon FGFR blockade, particularly when cells were stimulated with hypoxia-mimicking DFX (Figure 4D). In summary, ECs are susceptible to FGFR inhibition with BGJ398, especially when stimulated with bFGF or conditioned media from HCC cell lines.

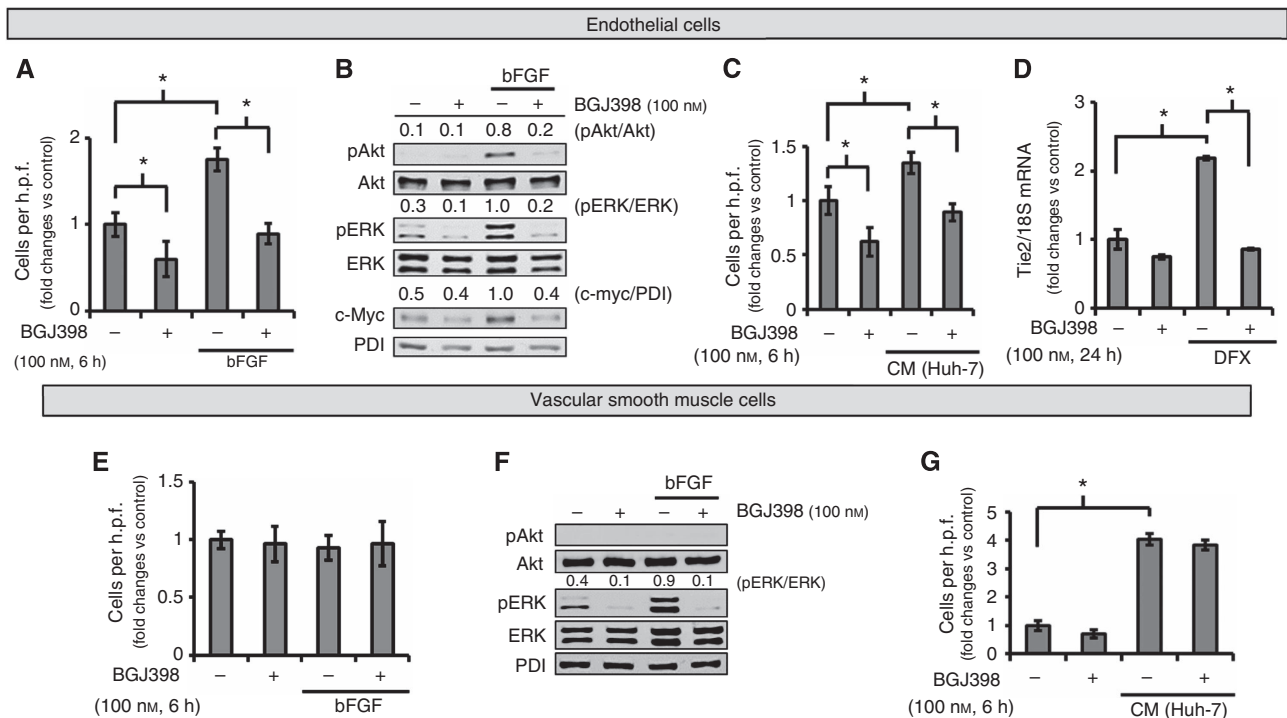
**Targeting FGFR in VSMCs *in vitro*.** Vascular smooth muscle cells are essential for functional vascular system development in tumours. MTT assays did not show any significant effects on VSMC growth by targeting FGFR with BGJ398 (Supplementary Figure 6A), which was also confirmed when cells were stimulated



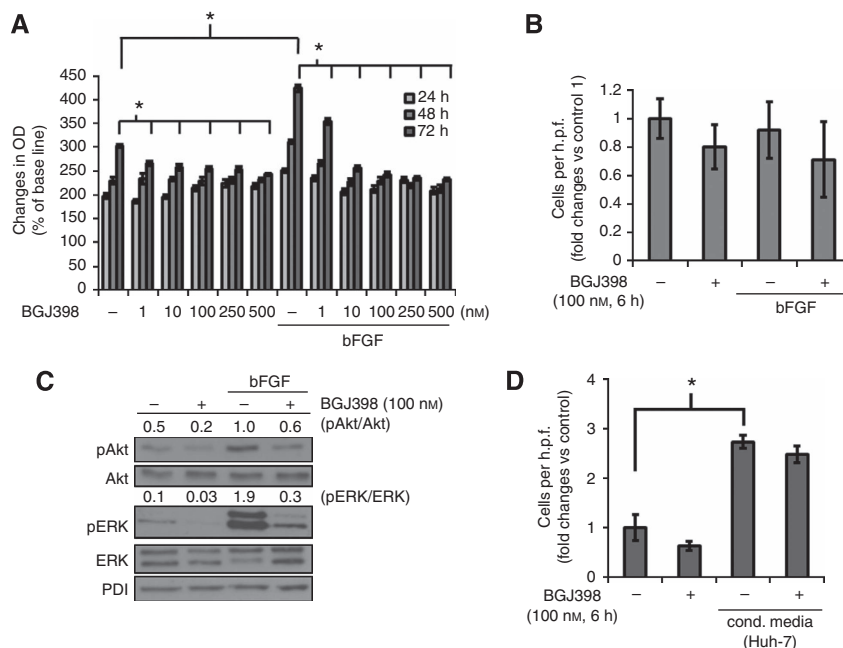
**Figure 3. Modulation of angiogenic markers in cancer cells by FGFR blockade.** (A) Fibroblast growth factor receptor inhibition reduces DFX-induced PDGF-B mRNA expression ( $*P < 0.05$ ). (B) Fibroblast growth factor receptor inhibition leads to impairment of constitutive and DFX-induced VEGF-A mRNA expression ( $*P < 0.05$ ). (C) Similar treatment with BGJ398 significantly impairs DFX-induced VEGF-A secretion, as determined by ELISA ( $*P < 0.05$ ). (D) Fibroblast growth factor receptor inhibition has no effect on bFGF mRNA expression. Bars = s.e.m. Results are shown for Huh-7.

with bFGF (data not shown). Similarly, constitutive and bFGF-induced migration was unaffected by BGJ398 (Figure 4E). However, constitutive ERK phosphorylation and c-myc expression was diminished after 24 h incubation with BGJ398 (Supplementary Figure 6B). Moreover, incubation with bFGF strongly induced ERK phosphorylation, which was impaired by BGJ398 (Figure 4F). Interestingly, CM from Huh-7 and HepG2 cells strongly induced VSMC migration, which, however, was unaffected by FGFR inhibition (Figure 4G for CM from Huh-7 and Supplementary Figure 6C for CM from HepG2). Finally, FGFR blockade had no effect on DFX-induced VEGF-A expression (Supplementary Figure 6D). Moreover, FGFR inhibition significantly increased bFGF mRNA expression (Supplementary Figure 6E), whereas no PDGF-B mRNA expression of was detectable in VSMCs (data not shown). Taken together, these results emphasise that targeting FGFR has only minor effects on recruitment and expression of angiogenic factors in VSMCs *in vitro*.

**FGFR blockade in HSCs *in vitro*.** Liver-specific pericytes (HSCs) affect the development and progression of liver malignancies and therefore were studied (Yin *et al*, 2013). Growth inhibition by FGFR blockade on HSCs were found after 72 h in MTT assays, especially upon bFGF stimulation (Figure 5A;  $IC_{50}$  (72 h) upon constitutive conditions:  $> 2500$  nM;  $IC_{50}$  (72 h) upon bFGF stimulation: 462 nM). Migration assays revealed no induction by bFGF, and BGJ398 had no significant effect on HSC motility (Figure 5B). Assessment of signalling pathways showed a marginal inhibition of constitutive ERK phosphorylation and c-myc expression, whereas no effect on Akt phosphorylation was observed (Supplementary Figure 7A). However, stimulation of HSCs with bFGF led to ERK and Akt phosphorylation that was



**Figure 4. Inhibition of FGFR in ECs and VSMCs.** (A) Basic FGF induces EC motility. Fibroblast growth factor receptor blockade impairs constitutive and bFGF-driven migration ( $*P < 0.05$ ). (B) Marked reduction of bFGF-induced ERK and Akt phosphorylation and constitutive c-myc expression by FGFR blockade in ECs. (C) After 6 h, FGFR inhibition led to a significant reduction in constitutive and conditioned medium (CM)-induced EC motility ( $*P < 0.05$ ). (D) Hypoxia-mimicking DFX strongly induces Tie2 expression. This can be significantly reduced by FGFR inhibition ( $*P < 0.05$ ). (E) Basic FGF had no effects on VSMC motility *in vitro*. (F) Nonetheless, treatment with BGJ398 abrogated bFGF-induced ERK phosphorylation in VSMCs. (G) Although CM from HCC cell lines strongly induced VSMC motility, no effects were observed by FGFR blockade ( $*P < 0.05$ ). Bars = s.e.m.



**Figure 5. Targeting FGFR in HSCs.** (A) Fibroblast growth factor receptor inhibition with BGJ398 leads to growth inhibition after 72 h ( $*P < 0.05$ ). Incubation with bFGF induces HSC growth, which can be abrogated by FGFR blockade ( $*P < 0.05$ ). (B) BGJ398 had no impact on constitutive and bFGF-induced HSC motility *in vitro*. (C) Basic FGF led to induction of Akt and ERK phosphorylation, which was markedly reduced by BGJ398. (D) Conditioned medium (CM) from human HCC cell lines induces HSC motility, although no effect was observed by FGFR blockade ( $*P < 0.05$ ).

markedly inhibited by BGJ398 (Figure 5C). To determine the recruitment of HSCs to HCC-specific sites, migration assays with CM from Huh-7 and HepG2 cells were performed. Results indicated no alterations of CM-induced HSC motility by FGFR blockade (Figure 5D and Supplementary Figure 7B). Finally, VEGF-A mRNA expression was not affected by FGFR blockade even upon stimulation with DFX (Supplementary Figure 7C). Interestingly, expression of PDGF-B mRNA was induced upon treatment with BGJ398. However, these results were conflicting as DFX led to a slight reduction of PDGF-B mRNA in HSCs (data not shown). Furthermore, expression of bFGF mRNA was not detectable in HSCs *in vitro* (data not shown). Taken together, results from these experiments indicate that targeting FGFR has an effect on growth and signalling, but not on recruitment of HSCs *in vitro*.

**Modulation of tumour growth in subcutaneous models.** Next, we assessed FGFR blockade with BGJ398 *in vivo* using a xenogeneic subcutaneous tumour model (Huh-7). We chose a low-dose ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  per day) and a bolus application ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$   $3 \times$  per week) schedule. Results showed a significant inhibition of tumour growth as reflected by tumour volume and tumour weight upon either daily ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or  $3 \times$  weekly ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) treatment schedules (Figure 6A and B). Nevertheless, the daily treatment tended to be more effective than the higher, less frequent, dosing schedule. This was subsequently confirmed in a subcutaneous syngeneic tumour model (Hepa129) showing again growth inhibition by daily ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) treatment (Figure 6C and D). However, efficacy of FGFR blockade in the syngeneic model was less impressive than in the xenogeneic model. Nonetheless, data from these experiments indicate that low-dose FGFR inhibition with BGJ398 is an effective therapy in HCC models *in vivo*.

**Combination of FGFR inhibition with mTOR blockade *in vitro*.** Results from our experiments, so far, show that FGFR blockade with BGJ398 is effective against tumour cells and ECs, whereas VSMCs and HSCs are less affected. To further improve antitumour activity of FGFR inhibition, we sought to combine

BGJ398 with a pericyte-targeting agent. From previous studies, we know that mTOR blockade impairs recruitment of pericytes, in particular VSMCs (Lang *et al*, 2009). Therefore, we assessed a combination of targeting FGFR with mTOR inhibition using rapamycin. *In vitro* experiments with HSCs showed an impairment of HSC growth upon combination of FGFR and mTOR inhibition (Figure 7A). Interestingly, treatment with rapamycin led to Akt phosphorylation and a slight increase in c-myc expression that was not affected by BGJ398 in HSCs (Figure 7B). Moreover, motility of HSCs was significantly reduced when FGFR inhibition was combined with mTOR blockade (Figure 7C and D). To further delineate the latter effect, we assessed other pathways that are involved in cell motility. Results showed no effect on FAK, RhoA, E-cadherin or N-cadherin. Of note, rapamycin led to an increase in paxillin expression (total and phosphorylated), which was reduced by a combination treatment with FGFR inhibition (Figure 7E). Nonetheless, these results did not explain the reduction in HSC motility and therefore warrant further exploration. However, our results clearly show that addition of the mTOR inhibitor rapamycin improved the efficacy of targeting FGFR in HSCs *in vitro*.

Finally, we used Huh-7 for comparative experiments with FGFR/mTOR blockade. In line with previous results from our group, we observed an induction of Akt phosphorylation upon rapamycin treatment (Lang *et al*, 2009). However, in contrast to HSCs, this phosphorylation was impaired upon combined treatment with the FGFR inhibitor BGJ398 (Supplementary Figure 8A). In addition, a significant reduction of *in vitro* growth in MTT assays was found upon FGFR/mTOR blockade (Supplementary Figure 8B). The latter was also confirmed in all other HCC cell lines used in the study (data not shown). In conclusion, our results demonstrate that combination of FGFR inhibition with mTOR blockade improves the efficacy of single-agent treatment also in cancer cells.

**Combined FGFR/mTOR blockade in the orthotopic tumour model.** As the local microenvironment is essential for tumour growth, we finally evaluated the effects of FGFR blockade in

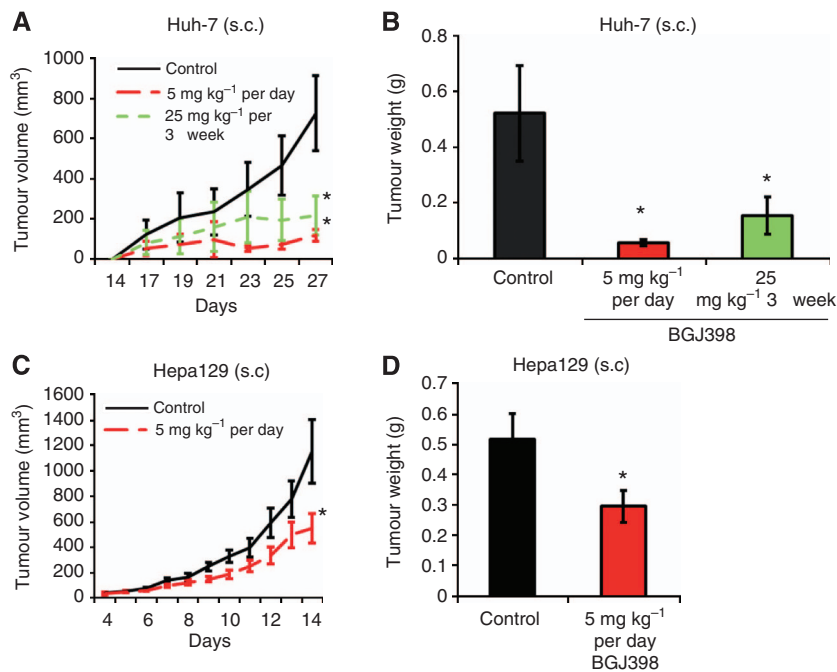


Figure 6. Subcutaneous (s.c.) tumour model. (A) In the subcutaneous xenograft model (Huh-7) treatment with FGFR inhibitor BGJ398 showed an inhibition of tumour growth upon both treatment schedules, 5 mg kg<sup>-1</sup> per day and 25 mg kg<sup>-1</sup> three times weekly (n = 6–8 mice per group; \*P < 0.05). (B) This was also reflected by final tumour weight (\*P < 0.05). (C) Similarly, the subcutaneous syngenic tumour model (Hepa129) confirmed significant growth inhibition upon daily treatment (5 mg kg<sup>-1</sup> per day) (n = 8–9 mice per group; \*P < 0.05). (D) Final tumour weight in the subcutaneous syngenic model (\*P < 0.05).

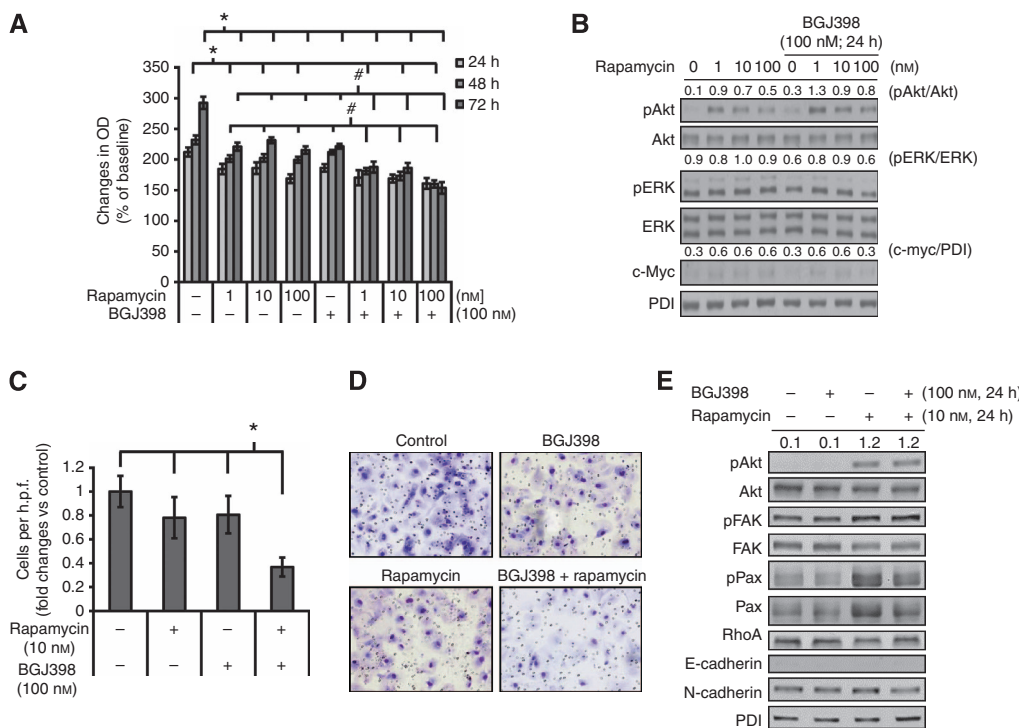
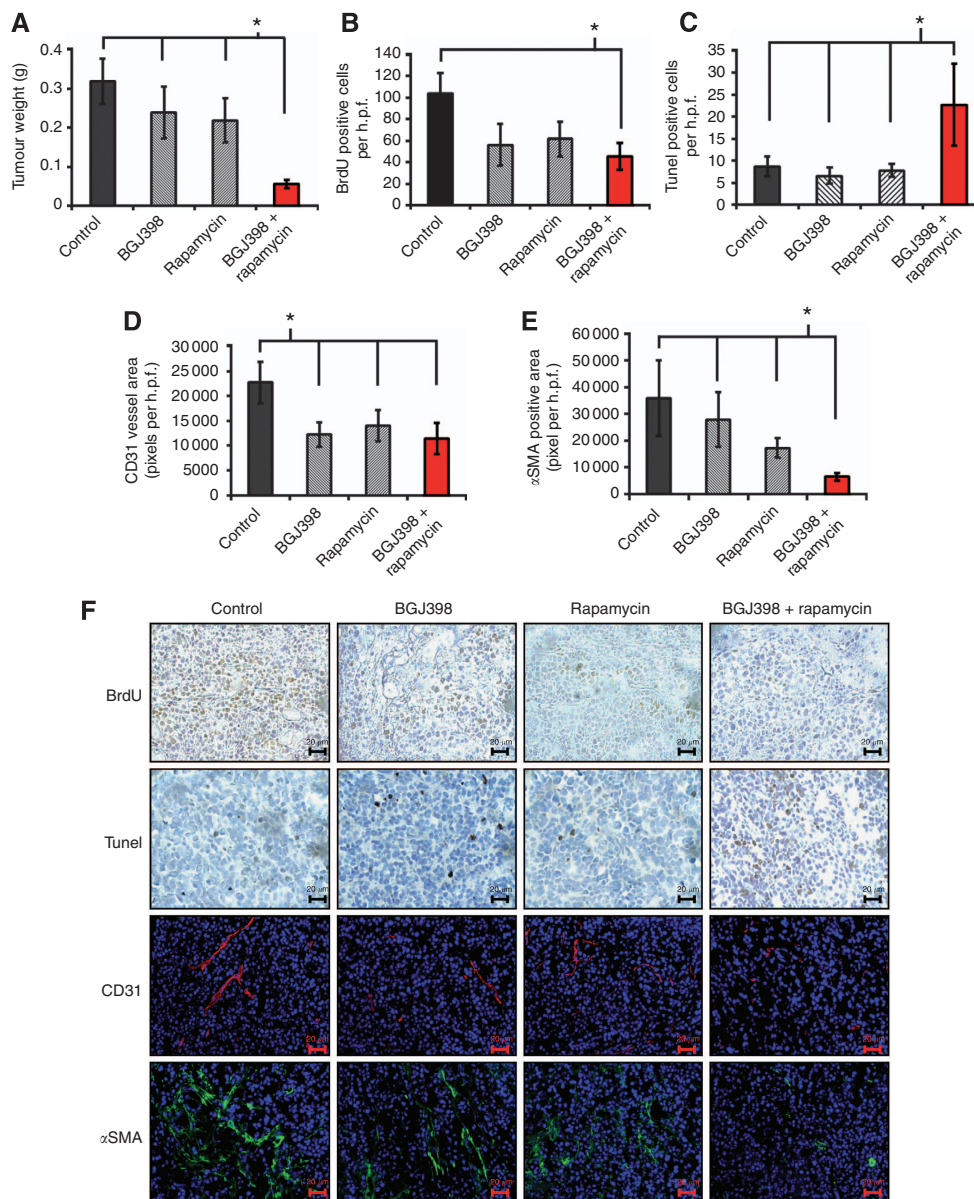


Figure 7. Combination of FGFR and mTOR blockade in HSCs. (A) Combination of FGFR inhibition with mTOR blockade impairs growth of HSCs *in vitro* compared with control (\*P < 0.05) and vs single agents (#P < 0.05). (B) Twenty four hours of treatment with rapamycin leads to induction of Akt phosphorylation in HSCs. Fibroblast growth factor receptor inhibition has no effect on this induction. (C) Combination of FGFR and mTOR inhibition significantly impairs HSC motility *in vitro* (\*P < 0.05). (D) Examples for HSCs from migration assays. (E) Incubation with rapamycin leads to induction of Akt phosphorylation in HSCs. No other pathways involved in cell motility were affected.

combination with mTOR inhibition on HCC growth in a syngenic orthotopic tumour model (Hepa129). Based on our previous experiments, we decided to combine the daily treatment of BGJ398

(5 mg kg<sup>-1</sup>) with low-dose rapamycin (0.2 mg kg<sup>-1</sup> per day). Results showed only minor inhibition of tumour growth (nonsignificant) upon treatment with either BGJ398 or rapamycin



**Figure 8.** Syngeneic orthotopic HCC model. (A) Slight, but not significant, inhibition of tumour growth upon treatment with either BGJ398 ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  per day) or rapamycin ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  per day) was observed. Combination of BGJ398 and rapamycin led to a significantly reduced final tumour weight. ( $n = 6\text{--}8$  mice per group). (B) Proliferating cells were significantly diminished upon combination of FGFR and mTOR inhibition. (C) Tumour cell apoptosis was strongly induced in the combined treatment group. (D) Vascularisation was impaired upon single-agent and combination therapy. (E) Pericytes were significantly reduced in the combination group but not upon single-agent therapy. (F) Examples for BrdU, TUNEL, CD31 and  $\alpha$ SMA staining (\* $P < 0.05$ ). Bars = s.e.m.

alone, whereas the combination of both agents was very effective in terms of reduced tumour weight (Figure 8A). No difference regarding animal weight between the groups was observed (data not shown). Immunohistochemical workup revealed an inhibition of tumour cell proliferation (Figure 8B and F) and an induction of tumour cell apoptosis that reached significance only upon combination of FGFR/mTOR blockade (Figure 8C and F). Furthermore, assessment of tumour vascularisation with CD31 staining showed reduced blood vessel area in all treatment groups, indicating no further enhanced antiangiogenic effect by combining FGFR and mTOR blockade (Figure 8D and F). Finally,  $\alpha$ SMA, a marker for VSMCs and HSCs, was strongly reduced in tumours treated with rapamycin and BGJ398 (Figure 8E and F). In conclusion, combined targeting of FGFR and mTOR impairs HCC tumour growth via effects on tumour cells and HSCs/VSMCs *in vivo*.

## DISCUSSION

The FGF/FGFR system is of particular importance for tumour growth in human cancer (reviewed in Dieci *et al*, 2013). With regard to HCC, Gaughhofer *et al* (2011) showed that at least one member of the FGF8 subfamily and/or the corresponding receptors (FGFR2–4) is overexpressed in  $\sim 80\%$  of HCC samples. Finn *et al* (2012) published a phase II study with brivanib, a VEGFR/FGFR inhibitor, showing promising results in patients pretreated with sorafenib. Although the follow-up phase III study failed its primary end point of overall survival, the substance showed some activity regarding time-to-progression, disease control rate and objective response rate (Llovet *et al*, 2012). Therefore, the concept of targeting FGFR remains under investigation. In our study, almost all FGFRs were expressed in 10 HCC samples. In contrast, both

isoforms of FGFR2 (IIIb and IIIc) were not detectable in stromal cells and most HCC cell lines (except for Hep3B). However, the meaning of FGFR2 in HCC remains controversial. Amann *et al* (2010) showed that reduced expression of FGFR2IIIb mediates a more aggressive behaviour of HCCs, whereas Harimoto *et al* (2010) found an association of FGFR2 expression with poor differentiation and poor survival in patients with HCC, although this study did not distinguish between the two isoforms of FGFR2. Nonetheless, *in vitro* experiments with HCC cell lines and ECs revealed that treatment with the FGFR inhibitor BGJ398 impaired oncogenic signalling and motility in HCC cell lines and ECs. Interestingly, HSCs and VSMCs that show a similar FGFR expression pattern as ECs respond differently to FGFR inhibition with regard to motility upon incubation with CM from cancer cells. These results suggest that recruitment of HSCs and VSMCs to HCC sites is dependent on factors other than FGFs such as PDGF-B (Kastanis *et al*, 2011; Azahri *et al*, 2012). Finally, we recognised that single-agent therapy with the FGFR inhibitor BGJ398 is most effective when the substance is used on a daily low-dose (metronomic) schedule. From the *in vivo* results, one can assume that no further improvement of antitumour activity is likely to be obtained by using higher doses of FGFR inhibitors in HCC therapy. This might be one of the reasons for the failure of the clinical trials with FGFR inhibitor. Nonetheless, results from our study further support the concept of targeting FGFR in HCC.

Angiogenesis is a hallmark of HCC development and progression and antiangiogenic therapy has shown some efficacy (Llovet *et al*, 2008). In this respect, results from our study show that VEGF-A and PDGF-B are reduced in cancer cells after FGFR inhibitor treatment. In addition, we found c-myc expression to be impaired in all cell types *in vitro* upon FGFR blockade. As c-myc is a major driver of tumour angiogenesis (Chen *et al*, 2013) and its expression has been associated with HCC recurrence (Cui *et al*, 2004), this is an important finding. Furthermore, FGFR inhibition in ECs led to reduced constitutive VEGF-A and, more interesting, Tie2 expression. As Tie2 encodes for the corresponding receptor for angiopoietin-2 (involved in resistance to antiangiogenic therapy (Daly *et al*, 2013)), one can deduce that treatment with BGJ398 impairs mechanisms involved in resistance to antiangiogenesis. To our knowledge, this is the first time that Tie2 expression has been linked to FGFR, although this finding warrants further evaluation. Nonetheless, treatment with BGJ398 led to impairment of ECs recruitment, which is a supportive evidence for the antiangiogenic properties of this agent. We conclude that FGFR inhibition impairs tumour angiogenesis and potentially prevents resistance to antiangiogenic therapies.

Stromal cells and the local microenvironment are of particular importance for tumour growth in HCC (Hernandez-Gea *et al*, 2013). As our study showed only modest effects of FGFR inhibition with BGJ398 on recruitment of VSMCs and HSCs, pericytes are obviously left relatively unaffected by only FGFR blockade. To address this therapeutic gap, we combined BGJ398 treatment with the mTOR inhibitor rapamycin. This approach was based on our previous findings that VSMC recruitment is impaired upon mTOR blockade (Lang *et al*, 2009), and additional results with HSCs indicating a similar enhanced effect of combined FGFR/mTOR inhibition. Interestingly, treatment with rapamycin led to an induction of Akt phosphorylation in cancer cells and HSCs, even though our previous results have shown that mTOR inhibition does not affect Akt phosphorylation in ECs and VSMCs (Lang *et al*, 2009). The induction of Akt phosphorylation in cancer cells has been described by others and us before. In particular, phosphorylation at Ser473 has been linked to the IGF-IR/IRS-1 system (Wan *et al*, 2007; Lang *et al*, 2010) and the mTORC2 complex (Sarbasov *et al*, 2005). Therefore, it remains unexpected that treatment with an FGFR inhibitor impairs mTOR inhibitor-mediated Akt phosphorylation in cancer cells. Guagnano *et al* (2011)

found a specificity of BGJ398 for FGFR, but neither the IGF-IR system nor mTORC2 was assessed in their work. Thus, an off-target effect might explain the observed inhibition rapamycin-induced Akt phosphorylation. More interestingly, HSCs obviously show different regulation of Akt phosphorylation as FGFR inhibition did not affect the activation of Akt in these cells. From our data, we cannot explain this, and, therefore, differences in the response of HSCs to mTOR inhibition compared with cancer cells clearly warrant further exploration.

Finally, combination of FGFR inhibition with mTOR blockade in the orthotopic model demonstrated an enhanced effect, whereas either agent alone was not effective. These results also strongly emphasise the importance of addressing the local microenvironment by using syngeneic orthotopic models to assess new therapeutic strategies (Talmadge *et al*, 2007; Hernandez-Gea *et al*, 2013). Moreover, reduced expression of  $\alpha$ SMA, a marker for pericytes (VSMCs, HSCs), in the combination group further supports our hypothesis that mTOR inhibition adds substantial benefit to FGFR inhibition via pericyte targeting. We speculate that FGFR inhibitors lack of efficacy on pericyte recruitment is a reason for the failure of clinical studies using these agents against HCC. In conclusion, our study provides evidence that the efficacy of FGFR inhibitors in HCC can be enhanced by adding pericyte-targeting agents such as rapamycin. Therefore, targeting FGFR/mTOR represents a novel and promising alternative strategy in the treatment of HCC.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Christine Wagner and Julia Redekopf for excellent technical assistance. This study was supported by the German Research Foundation (LA1988/2-1; LA1988/3-1; LA1988/4-1) to SAL and CH (HE2458/14-1; HE 2458/15-1) and the Else-Kröner Fresenius Foundation (EKFS) to SAL.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Amann T, Bataille F, Spruss T, Dettmer K, Wild P, Liedtke C, Muhlbauer M, Kiefer P, Oefner PJ, Trautwein C, Bosserhoff AK, Hellerbrand C (2010) Reduced expression of fibroblast growth factor receptor 2IIIb in hepatocellular carcinoma induces a more aggressive growth. *Am J Pathol* **176**(3): 1433–1442.
- Amann T, Bataille F, Spruss T, Muhlbauer M, Gabele E, Scholmerich J, Kiefer P, Bosserhoff AK, Hellerbrand C (2009) Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **100**(4): 646–653.
- Azahri NS, Di Bartolo BA, Khachigian LM, Kavurma MM (2012) Sp1, acetylated histone-3 and p300 regulate TRAIL transcription: mechanisms of PDGF-BB-mediated VSMC proliferation and migration. *J Cell Biochem* **113**(8): 2597–2606.
- Bruix J, Sherman M (2011) Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* **53**(3): 1020–1022.
- Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **8**(4): 299–309.
- Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M (2013) Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene* **33**(14): 1743–1754.
- Chen C, Cai SX, Wang GH, Cao XN, Yang X, Luo XL, Feng YD, Hu JB (2013) c-Myc enhances colon cancer cell-mediated angiogenesis through the regulation of HIF-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **430**(2): 505–511.

- Cui J, Dong BW, Liang P, Yu XL, Yu DJ (2004) Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol* **10**(10): 1533–1536.
- Daly C, Eichten A, Castanaro C, Pasnikowski E, Adler A, Lalani AS, Papadopoulos N, Kyle AH, Minchinton AI, Yancopoulos GD, Thurston G (2013) Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Res* **73**(1): 108–118.
- Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC (2013) Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov* **3**(3): 264–279.
- Finn RS, Kang YK, Mulcahy M, Polite BN, Lim HY, Walters I, Baudelet C, Manekas D, Park JW (2012) Phase II, open-label study of brivanib as second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **18**(7): 2090–2098.
- Gauglhofer C, Sagmeister S, Schrottmaier W, Fischer C, Rodgarkia-Dara C, Mohr T, Stattner S, Bichler C, Kandioler D, Wrba F, Schulte-Hermann R, Holzmann K, Grusch M, Marian B, Berger W, Grasl-Kraupp B (2011) Up-regulation of the fibroblast growth factor 8 subfamily in human hepatocellular carcinoma for cell survival and neoangiogenesis. *Hepatology* **53**(3): 854–864.
- Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, Stamm C, Brueggen J, Jensen MR, Schnell C, Schmid H, Wartmann M, Berghausen J, Drueckes P, Zimmerlin A, Bussiere D, Murray J, Graus Porta D (2011) Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* **54**(20): 7066–7083.
- Harimoto N, Taguchi K, Shirabe K, Adachi E, Sakaguchi Y, Toh Y, Okamura T, Kayashima H, Taketomi A, Maehara Y (2010) The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma. *Oncology* **78**(5-6): 361–368.
- Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM (2013) Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **144**(3): 512–527.
- Hu CT, Cheng CC, Pan SM, Wu JR, Wu WS (2013) PKC mediates fluctuant ERK-paxillin signaling for hepatocyte growth factor-induced migration of hepatoma cell HepG2. *Cell Signal* **25**(6): 1457–1467.
- Huynh H, Chow KH, Soo KC, Toh HC, Choo SP, Foo KF, Poon D, Ngo VC, Tran E (2009) RAD001 (everolimus) inhibits tumour growth in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* **13**(7): 1371–1380.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**(2): 69–90.
- Kastanis GJ, Hernandez-Nazara Z, Nieto N, Rincon-Sanchez AR, Popratiloff A, Dominguez-Rosales JA, Lechuga CG, Rojkind M (2011) The role of dystroglycan in PDGF-BB-dependent migration of activated hepatic stellate cells/myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**(3): G464–G474.
- Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, Ellis LM, Bolder U, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2007) Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* **120**(8): 1803–1810.
- Lang SA, Hackl C, Moser C, Fichtner-Feigl S, Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2010) Implication of RICTOR in the mTOR inhibitor-mediated induction of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) and human epidermal growth factor receptor-2 (Her2) expression in gastrointestinal cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1803**(4): 435–442.
- Lang SA, Moser C, Fichtner-Feigl S, Schachtschneider P, Hellerbrand C, Schmitz V, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2009) Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* **49**(2): 523–532.
- Lieu C, Heymach J, Overman M, Tran H, Kopetz S (2011) Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clin Cancer Res* **17**(19): 6130–6139.
- Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, Kang YK, Assenat E, Lim HY, Boige V, Mathurin P, Fartoux L, Lin DY, Bruix J, Poon RT, Sherman M, Blanc JF, Finn R, Tak WY, Chao Y, Ezzeddine R, Liu D, Walters I, Park JW (2012) Brivanib Versus placebo in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) who failed or were intolerant to sorafenib: results from the Phase 3 Brisk-PS Study. *J Hepatol* **56**: S549–S549.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**(4): 378–390.
- Matter MS, Decaens T, Andersen JB, Thorgeirsson SS (2013) Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: current state and future trends. *J Hepatol* **60**(4): 855–865.
- Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST (2007) High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol* **14**(6): 1835–1845.
- Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J (2001) Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* **182**(3): 298–304.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712): 1098–1101.
- Taeger J, Moser C, Hellerbrand C, Mycielska ME, Glockzin G, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O, Lang SA (2011) Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* **10**(11): 2157–2167.
- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A (2007) Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* **170**(3): 793–804.
- Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ (2007) Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* **26**(13): 1932–1940.
- Wang YH, Dong YY, Wang WM, Xie XY, Wang ZM, Chen RX, Chen J, Gao DM, Cui JF, Ren ZG (2013) Vascular endothelial cells facilitated HCC invasion and metastasis through the Akt and NF-kappaB pathways induced by paracrine cytokines. *J Exp Clin Cancer Res* **32**(1): 51.
- Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY (2005) Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **4**(2): 220–226.
- Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY (2013) Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest* **123**(5): 1902–1910.
- Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK (2011) HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* **8**(5): 292–301.

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 Unported License.

Supplementary Information accompanies this paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)