

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik/Institut für Pathologie m. Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

EGFR Proteinexpression und genetische Alterationen in Nierenzellkarzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Dorothea Angelika Rump

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.07.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter: Prof. Dr. M. Graefen

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachterin: ---

Inhaltsverzeichnis

I.	Artikel	S.1
II.	Darstellung der Publikation	S.9
	1.0 Einleitung	S.9
	2.0 Material und Methoden	S.10
	2.1 Patienten	S.10
	2.2 Immunhistochemie	S.11
	2.3 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung	S.11
	2.4 EGFR Mutationsanalyse	S.12
	2.5 Statistik	S.12
	3.0 Ergebnisse	S.12
	3.1 Technische Probleme	S.12
	3.2 Immunhistochemie	S.12
	3.3 EGFR FISH	S.13
	3.4 EGFR Mutation	S.14
	4.0 Diskussion	S.14
	5.0 Zusammenfassung	S.17
	6.0 Abbildungen und Tabellen	S.19
	7.0 Literaturverzeichnis	S.23
III.	Danksagung	S.26
V.	Eidesstattliche Erklärung	S.27

Epidermal Growth Factor Receptor Protein Expression and Genomic Alterations in Renal Cell Carcinoma

Sarah Minner, MD^{1,2}; Dorothea Rump, MD¹; Pierre Tennstedt, PhD^{1,2}; Ronald Simon, PhD^{1,2}; Eike Burandt, MD^{1,2}; Luigi Terracciano, MD³; Holger Moch, MD⁴; Waldemar Wilczak, MD^{1,2}; Carsten Bokemeyer, MD^{2,5}; Margit Fisch, MD^{2,6}; Guido Sauter, MD^{1,2}, and Christian Eichelberg, MD^{2,6}

BACKGROUND: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is involved in the progression of many cancer types and represents an important therapeutic target. **METHODS:** To determine the role of EGFR in renal cell carcinoma (RCC), the authors analyzed 1088 tumors in a tissue microarray format by using immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH). A subset of 63 cancers was sequenced for EGFR exon 18 through 21 mutations. **RESULTS:** EGFR expression was observed in 83.8% of clear cell carcinomas, in 68.2% of papillary carcinomas, in 75% of chromophobe carcinomas, and in 50% of oncocytomas. Within clear cell carcinomas, the expression level of EGFR was associated with high tumor grade ($P < .0001$), advanced pathologic tumor classification ($P < .0001$), and, to a lesser extent, lymph node status ($P = .0326$). FISH analysis revealed increased *EGFR* copy numbers (high polysomy) in 5.5% of tumors and amplification in 0.1% of tumors. *EGFR* copy number increases were associated with EGFR protein expression ($P = .0015$). Within clear cell carcinomas, *EGFR* copy number increases were associated with high tumor grade ($P < .0001$), advanced pathologic tumor classification ($P = .0472$), and lymph node status ($P = .0065$). No exon 18 through 21 mutations were identified in 63 sequenced tumors. **CONCLUSIONS:** The authors concluded that increased EGFR expression occurs in a fraction of patients who have RCC with an unfavorable histologic phenotype. *EGFR* copy number gain represents 1 possible cause for EGFR overexpression; however, many over expressing tumors have a normal genotype. High polysomy (which is suggested to be predictive of a response to tyrosine kinase inhibitors) occurs in 5.6% of RCCs. Thus, the potential utility of anti-EGFR medications may be worth further investigation in a small but significant subset of patients with RCC. *Cancer* 2011;000:000–000. © 2011 American Cancer Society.

KEYWORDS: renal cell carcinoma, epidermal growth factor receptor, tissue microarray, copy number changes.

INTRODUCTION

The epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene is located on chromosome 7p12 and codes for an 185-kD transmembrane tyrosine kinase.¹ EGFR plays an essential role in the control of both normal and malignant cell growth. Increased expression of EGFR has been described in many different tumor types and has been proposed as a prognostic parameter (for review, see Hynes and Lane²). In renal cell carcinoma (RCC), studies using immunohistochemistry (IHC) have reported frequencies of increased EGFR expression between 50% and 90%.^{3–8} Many studies have not reported relevant associations between EGFR expression and grade or stage of RCC.^{5,9,10} The prognostic significance of EGFR overexpression in RCC with respect to both survival and disease-free period remains controversial.^{3,4,7,8,11,12}

Along with its potential prognostic relevance, EGFR has gained considerable additional importance because of its role as a drug target. A variety of anti-EGFR drugs currently are being approved by the US Food and Drug Administration or tested in clinical trials. This approach includes small inhibitory molecules, such as gefitinib or erlotinib, as well as antibodies, such as cetuximab.¹³ Most experience with anti-EGFR drugs has been obtained in lung cancer and colon cancer.

Corresponding author: Sarah Minner, MD, Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinstr. 52, 20246 Hamburg, Germany; Fax: (011) 49 40 7410 56815; s.minner@uke.uni-hamburg.de

¹Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²Hubertus Wald Tumor Center, University Cancer Center Hamburg, Hamburg, Germany; ³Institute of Pathology, University of Basel, Basel, Switzerland; ⁴Institute of Pathology, University of Zurich, Zurich, Switzerland; ⁵Department of Oncology, Hematology, and Bone Marrow Transplantation With Section of Pneumology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany; ⁶Department of Urology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

The first 2 authors contributed equally to this article.

DOI: 10.1002/cncr.26436, **Received:** February 28, 2011; **Revised:** June 11, 2011; **Accepted:** June 17, 2011, **Published online** in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

At least in lung cancer, the number of good responders to anti-EGFR drugs appears to be relatively low. However, the treatment response is substantial in some patients, most of whom have mutations in exons 18 through 21 of the *EGFR* gene.¹⁴ Increased gene copy number also has been proposed as a predictor of response to anti-EGFR therapy in patients with lung cancer.¹³

To evaluate the significance of EGFR alterations in RCC and to investigate the potential utility of anti-EGFR drugs in this cancer type, we analyzed EGFR expression, mutations in exons 18 through 21, and gene copy number changes in >1000 RCCs, including >700 with clinical follow-up data.

MATERIALS AND METHODS

Patients

For the construction of the renal tumor microarray (TMA) blocks, a collection of 585 renal tumors after nephrectomy was available from the archives of the institutes of Pathology of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. In addition, an existing TMA ($n = 503$) constructed at the University Hospital (Basel, Switzerland) was available for this study. The tumors were staged according to the sixth edition of the TNM classification, graded according to the grading system published by Fuhrman et al,¹⁵ and histologically subtyped according to the recommendations of the International Union Against Cancer. The tumors from 1 TMA were reviewed by 1 specialized uropathologist (H.M.). Grading information for the other tumors was taken from the initial pathology report only if it was clearly specified which grading system (ie, Thoenes/Fuhrman) had been used. Because the majority of tumors had been graded according to the Fuhrman grading system, this 4-tiered system was used for subsequent calculations. Grade ($n = 147$), pathologic tumor classification (pT) ($n = 2$), pathologic lymph node status (pN) ($n = 577$), and clinical metastasis classification (cM) ($n = 376$) data were missing in subsets of patients. Core tissue biopsies (0.6 mm in greatest dimension) were taken from carefully selected, morphologically representative regions of individual paraffin-embedded renal tumors (donor blocks) and precisely arrayed into a new recipient paraffin block (45 × 20 mm) using a custom-built instrument. Five-millimeter sections of the resulting tumor TMA tissue block were transferred to glass slides using the paraffin sectioning aid system (adhesive-coated slides [PSA-CS4x], adhesive tape, and ultraviolet lamp; all from Instrumedics Inc., Hackensack, NJ) to support the

Table 1. Characteristics of 1034 Patients With Renal Cell Carcinoma

Variable	No. of Patients
Pathologic tumor classification	
pT1	467
pT2	154
≥pT3	411
Pathologic lymph node status	
pN0	388
pN+	69
Clinical metastasis classification	
cM0	508
cM1	150
Fuhrman grade	
1	160
2	387
3	239
4	101
Follow-up, mo	
Mean	53
Median	35

cohesion of 0.6-mm array elements. Follow-up data were available for 737 patients. These were collected either from local cancer registries (Basel, Switzerland) or from the attending primary physicians (Hamburg, Germany). Clinical and pathologic characteristics of all patients from both TMAs are summarized in Table 1.

Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were analyzed on 1 day in 1 experiment. The monoclonal EGFR antibody (clone 2-18C9; Dako, Hamburg, Germany) was used according to the protocol of the manufacturer. Slides were deparaffinized and treated with proteinase K for 5 minutes at room temperature. Bound primary antibody was observed using the Pharm DX-kit (Dako). Only the staining intensity (0, 1+, 2+, or 3+) of the membranous EGFR staining was scored for each tissue spot, because the fraction of tumor cells stained was almost 100% in each sample. Tissue samples without definite RCC were excluded.

Fluorescence in Situ Hybridization

A 4-μm TMA section was used for 2-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH). For proteolytic slide pretreatment, a commercial kit was used (Paraffin Pretreatment Reagent Kit; Vysis, Downers Grove, IL). A Spectrum Orange-labeled *EGFR* probe was used together with a Spectrum Green-labeled centromere 7 probe (PathVysis; Vysis). Before hybridization, TMA sections were

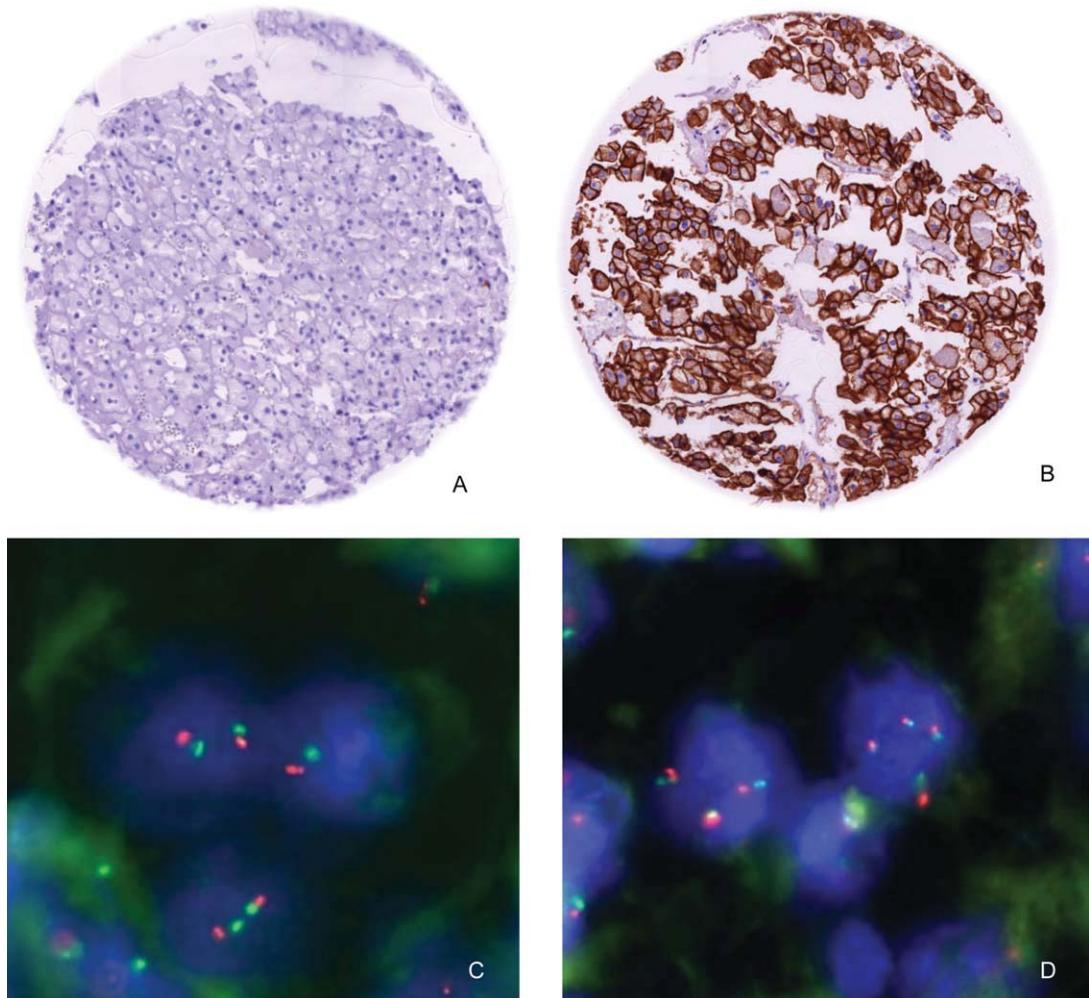


Figure 1. These are representative images of membranous epidermal growth factor receptor (EGFR) immunostaining (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). (A) This is an EGFR IHC-negative chromophobe carcinoma. (B) EGFR IHC 3+ staining is shown in a clear cell carcinoma. (C) This is clear cell carcinoma with disomy. Most cells contain 2 red EGFR signals and 2 green centromere 7 signals. (D) This is clear cell carcinoma with polysomy. The image shows 2 tumor cells with either 3 green centromere 7 signals and 3 red EGFR signals or 4 green centromere 7 signals and 4 red EGFR signals.

deparaffinized, air dried, and dehydrated in 70%, 85% and 100% ethanol followed by denaturation for 5 minutes at 74°C in 70% formamide-2 times standard saline citrate solution. After overnight hybridization at 37°C in a humidified chamber, the slides were washed and counterstained with 0.2 µM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in an antifade solution. For each tumor, 20 cells were scored. The results were then categorized according to the criteria defined by Cappuzzo et al¹⁶: 1) disomy (≤ 2 copies in $>90\%$ of cells); 2) low trisomy (≤ 2 copies in $\geq 40\%$ of cells, 3 copies in 10%-40% of cells, ≥ 4 copies in $<10\%$ of cells); 3) high trisomy (≤ 2 copies in $\geq 40\%$ of cells, 3 copies in $\geq 40\%$ of cells, ≥ 4 copies in $<10\%$ of cells); 4) low polysomy (≥ 4 copies in 10%-40% of cells); 5) high polysomy (≥ 4 copies in $\geq 40\%$ of cells);

and 6) gene amplification (defined by presence of tight *EGFR* gene clusters and a ratio of *EGFR* gene to chromosome of ≥ 2 or ≥ 15 copies of *EGFR* per cell in $\geq 10\%$ of analyzed cells).

EGFR Mutation Analysis

Genomic DNA was extracted from 63 RCCs (51 clear cell carcinomas and 11 chromophobe carcinomas) according to standard procedures. “Macrodissection” with a scalpel was carried out on tissue sections to ensure a high content ($>80\%$) of tumor cells in the tissue samples. Genetic analysis of the *EGFR* gene was performed by PCR amplification of exons 18, 19, 20, and 21 with subsequent sequencing of the PCR products exactly following the protocol of Lynch et al.¹⁴

Statistical Analysis

Statistical calculations were performed using JMP statistical software (SAS Institute, Cary, NC). Contingency tables were calculated with the chi-square test and the likelihood test. Survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method and were compared with the log-rank test.

RESULTS

Technical Issues

A fraction of tissue samples was noninformative because of the complete lack of tissue samples, the absence of unequivocal cancer tissue, or the absence of countable FISH signals. The percentage of noninterpretable samples was 12.8% for EGFR IHC and 32.8% for *EGFR* FISH.

Table 2. Frequency and Intensity of Epidermal Growth Factor Receptor Immunostaining in Different Tumor Types

Tumor Type	EGFR Staining Intensity, %				<i>P</i>
	0	1+	2+	3+	
Clear cell RCC (n = 711)	16.2	32.5	35.4	15.9	<.0001
Chromophobe RCC (n = 32)	25	43.8	12.5	18.7	
Papillary RCC (n = 126)	31.8	35.7	27	5.5	
Oncocytoma (n = 50)	50	44	4	2	

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor; RCC: renal cell carcinoma.

Table 3. Associations of Epidermal Growth Factor Receptor EGFR Immunostaining With Clinicopathologic Features in Clear Cell Renal Cell Carcinoma

Variable	EGFR Staining Intensity, %				<i>P</i>
	0	1+	2+	3+	
Pathologic tumor classification					
pT1 (n = 308)	14.6	36.7	39.3	9.4	<.0001
pT2 (n = 90)	20	36.7	32.2	11.1	
pT3 (n = 296)	17.6	27.4	32.7	22.3	
pT4 (n = 9)	0	22.2	22.2	55.6	
Fuhrman grade					
1 (n = 117)	6.9	44.4	43.6	5.1	<.0001
2 (n = 271)	17	32.8	36.2	14	
3 (n = 167)	22.2	31.1	28.1	18.6	
4 (n = 86)	19.8	19.8	36	24.4	
Pathologic lymph node status					
pN0 (n = 258)	9.3	36.1	36.8	17.8	.0326
pN1 (n = 48)	25	25	31.2	18.8	
Clinical metastasis classification					
cM0 (n = 342)	17.3	34.5	34.5	13.7	.0101
cM1 (n = 117)	12.8	23.9	37.6	25.7	

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor.

Immunohistochemistry

Positive EGFR immunostaining was observed in 756 of 948 interpretable renal tumors (79.7%). Representative images are provided in Figure 1A,B. EGFR staining was considered weak in 324 positive tumors (42.8%), moderate in 301 positive tumors (39.9%), and strong in 131 positive tumors (17.3%). The frequency and intensity of EGFR immunostaining varied between different tumor types (Table 2). EGFR expression was most prominent in clear cell carcinomas, and oncocytomas had the least EGFR expression. Papillary and chromophobe carcinomas had intermediate expression. In 711 clear cell carcinomas, EGFR expression was strongly associated with high grade ($P < .0001$) and advanced tumor stage ($P < .0001$). Significant associations also were observed with the pN and cM categories, although these relations were not as strong (Table 3). No significant association was observed between EGFR expression and overall survival in 500 clear cell carcinomas ($P = .0975$). In 126 papillary carcinomas, EGFR expression was not clearly associated with any of the clinicopathologic tumor parameters (Table 4) or with overall survival ($P = .8165$).

EGFR Fluorescence in Situ Hybridization

In total, 731 cancers were successfully analyzed by FISH and had countable red *EGFR* signals and green centromere 7 signals. According to the criteria of Cappuzzo et al, there were 440 tumors with disomy (60.2%), 130

Table 4. Associations of Epidermal Growth Factor Receptor Immunostaining With Clinicopathologic Features in Papillary Renal Cell Carcinoma

Variable	EGFR Immunostaining Intensity, %				P
	0	1+	2+	3+	
Pathologic tumor classification					
pT1 (n = 62)	37.1	38.7	24.2	0	.0493
pT2 (n = 30)	20	40.0	26.7	13.3	
pT3 (n = 30)	36.7	23.3	30	10	
pT4 (n = 1)	0	0	100	0	
Fuhrman grade					
1 (n = 14)	21.4	42.9	28.6	7.1	.2527
2 (n = 55)	30.9	34.6	30.9	3.6	
3 (n = 36)	41.7	36.1	13.9	8.3	
4 (n = 4)	25	0	75	0	
Pathologic lymph node status					
pN0 (n = 50)	32	30	32	6	.0695
pN1 (n = 9)	33.3	0	44.5	22.2	
Clinical metastasis classification					
cM0 (n = 56)	32.1	42.9	19.6	5.4	.5126
cM1 (n = 7)	28.6	28.6	42.8	0	

Abbreviations: EGFR, f epidermal growth factor receptor.

Table 5. Associations of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Copy Number Changes With EGFR Immunostaining in Clear Cell Renal Cell Carcinoma

EGFR Immunostaining Intensity	≤ 2 EGFR Copy Numbers, %	>2 EGFR Copy Numbers, %	P
0 (n = 80)	9.3	12	.0015
1+ (n = 247)	37.6	26.9	
2+ (n = 302)	40.1	39.8	
3+ (n = 127)	13	21.2	

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor.

tumors with low trisomy (17.8%), 6 tumors with high trisomy (0.8%), 114 tumors with low polysomy (15.6%), 40 tumors with high polysomy (5.5%), and 1 (0.1%) amplification in a clear cell carcinoma. If only the average gene copy number was considered, then there were 420 tumors (56.4%) with ≤ 2 copies per tumor cell and 325 tumors (43.6%) with >2 copies per tumor cell. Representative images from FISH results are provided in Figure 1C,D. A comparison of different histologic tumor types revealed minor differences in the frequency of copy number alterations in the large group of clear cell carcinomas, papillary carcinomas, and chromophobe carcinomas. This was observed both in an analysis according to Cappuzzo et al criteria and in an analysis of average gene copy numbers. In 541 FISH-interpretable clear cell carcinomas, there was only a minor increase of EGFR copy number gains in

tumors with worse clinicopathological features. This difference reached statistical significance for grade ($P < .0001$), for pT stage ($P = .0472$), and for lymph node status ($P = .0065$). A significant association with phenotype in the smaller group of 105 FISH-interpretable papillary carcinomas was observed only for grade ($P = .0224$).

Increased EGFR copy number was associated significantly with elevated EGFR protein expression ($P = .0015$). Strong EGFR immunostaining was observed in 13% of cancers with ≤ 2 EGFR signals per cell and in 21% of cancers with >2 EGFR signals per cell. The data on clear cell carcinomas are provided in Table 5. However, many cancers with strong EGFR expression lacked significant EGFR gene copy number aberrations.

EGFR Mutations

No exon 18 through 21 mutations were observed in 63 sequenced cancers.

DISCUSSION

Detectable EGFR expression was observed in 79.6% of interpretable RCC specimens in this study. Although only 1 tissue sample that measured 0.6 mm in greatest dimension was analyzed per patient, this number is well in the range of previous studies. In several previous studies, the mean rate of EGFR positivity was 70%, and the range spans from 47%⁷ to 93.2%.⁸ The data from the current study demonstrate that the frequency and intensity of

EGFR expression vary significantly between different histologic tumor types. Clear cell carcinomas had a greater frequency of moderately or strongly positive results than papillary and chromophobe carcinomas. This observation is in line with the results published by Uhlman et al,¹² who reported EGFR positivity in 73% of solid pattern tumors but in only 21% of papillary carcinomas. Moch et al⁶ reported EGFR positivity in 40% of papillary carcinomas compared with 81% of clear cell carcinomas. The rate of positivity was particularly low in oncocytomas. Although it is difficult to transfer research data obtained on TMAs into clinical application on large sections, and only a small number of oncocytomas and chromophobe carcinomas were analyzed, it appears possible that EGFR expression analysis could assist in the distinction between oncocytoma and chromophobe carcinoma. The particular high frequency of EGFR expression in clear cell carcinomas may be caused by loss of von Hippel-Lindau (*VHL*) gene function, which occurs in the vast majority of clear cell carcinomas. It has been demonstrated that loss of *VHL* gene function results in hypoxia-inducible factor (HIF)-mediated transforming growth factor- α expression and EGFR autocrine signaling,¹⁷ which may lead to EGFR overexpression in the absence of *EGFR* gene copy gain.

The analysis of associations between EGFR expression and clinical or pathologic data were limited to histologically defined tumor entities. This is necessary because a variety of studies have highlighted marked biologic differences between histologically defined kidney tumor types. These differences also are corroborated by variable EGFR expression. Therefore, only clear cell carcinomas and papillary carcinomas (the largest tumor groups) were analyzed further. Particularly significant associations with histologic tumor grade suggest that EGFR overexpression may be linked to tumor dedifferentiation in clear cell carcinoma. In these tumors, several other groups also have reported a positive association between EGFR expression and high histologic tumor grade.^{3,12} Despite the significant associations with unfavorable tumor features, there was no significant association between EGFR expression and patient outcome in our 500 clear cell carcinomas that had follow-up data. Several other authors previously suggested a link between EGFR expression and poor outcome in small sets of mixed kidney tumors. Significant associations with prognosis were reported by Merseburger et al⁷ in 149 tumors, by Stumm et al³ in 34 tumors, and by Uhlman et al¹² in 175 tumors. Altogether, the existing data argue for a significant but not very strong association

of EGFR expression with unfavorable phenotype and prognosis in clear cell carcinomas.

Previous studies have suggested, however, that the activation status of EGFR, which is defined by phosphorylation, may have a stronger impact on the clinical course than EGFR overexpression. Kanematsu et al¹⁸ observed that phosphorylation, but not overexpression, of EGFR was associated with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. A correlation between phosphorylated EGFR and clinical outcome also has been reported for breast cancer,¹⁹ cervical cancer,²⁰ and prostate cancer.²¹

The TMA method is particularly suited for comparing gene copy number with protein expression, because the analysis is limited to absolutely identical tumor areas if consecutive sections are used. This excludes any possible impact of tumor heterogeneity on the results. The significant association of *EGFR* copy number gains with EGFR protein expression emphasizes the strong impact even of low-level DNA copy number changes on EGFR gene expression. This is in line with data from a rapidly increasing number of studies comparing comparative genomic hybridization array data with RNA expression screening data.²² In those studies, significant RNA overexpression is observed regularly for most of the genes that are mildly over represented on the DNA level.²³ An increasing number of reports suggest a role of minimal *EGFR* gene copy number gains in predicting response to anti-EGFR drugs in lung and brain cancers.^{16,24-26} Applying criteria for the categorization of *EGFR* gene copy number similar to criteria used in those lung cancer studies, we observed that approximately 5.6% of RCCs had high polysomy/amplification. These findings were associated with response to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. The simultaneous increase of centromere 7 copy number in virtually all of these tumors suggests that a gain of the entire chromosome 7 (polysomy 7) caused most *EGFR* copy number gains. Previous studies have reported *EGFR* amplification in 0.6%²⁷ and 4.5%⁹ of RCCs.

The current FISH data possibly suggest that a fraction of RCCs may be responsive to anti-EGFR therapies. To our knowledge, only a few studies to date have analyzed anti-EGFR therapy in RCC.²⁸⁻³³ Generally, the data do not provide strong evidence for a critical effect of these drugs in RCC, but those studies did not select patients based on *EGFR* gene copy number or other refined molecular analysis.

The presence of *EGFR* mutations in the exons 18 through 21 of EGFR represents the strongest predictor of

response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung cancer. The absence of *EGFR* mutations in our 63 cancers is in line with results from other studies. No *EGFR* mutations were reported in 16 RCCs by Lynch et al,¹⁴ in 19 RCCS by Sakaeda et al,³⁴ or in 50 RCCs by Szymanska et al.³⁵

In summary, increased EGFR expression is frequent in RCC and is weakly associated with an unfavorable tumor phenotype. High-level EGFR expression can be caused by high *EGFR* polysomy, which was observed in approximately 5% of all tumors. This feature is associated with an increased likelihood of attaining a response to tyrosine kinase inhibitors in patients with lung cancer; however, data on selected cohorts of patients with RCC are not available. *EGFR* gene mutations, the strongest predictor of a possible response to tyrosine kinase inhibitor in other tumor types, were not identified in 63 analyzed cancers from our series.

FUNDING SOURCES

No specific funding was disclosed.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

The authors made no disclosures.

REFERENCES

- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-137.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:341-354.
- Stumm G, Eberwein S, Rostock-Wolf S, et al. Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis. *Int J Cancer*. 1996;69:17-22.
- Moch H, Sauter G, Buchholz N, et al. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol*. 1997;28:1255-1259.
- Amare Kadam PS, Varghese C, Bharde SH, et al. Proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor (EGFr) status in renal cell carcinoma patients with polysomy of chromosome 7. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;125:139-146.
- Moch H, Sauter G, Gasser TC, et al. EGF-r gene copy number changes in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *J Pathol*. 1998;184:424-429.
- Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, et al. Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer. *Anticancer Res* 25(3B):1901-1907, 2005.
- Cohen D, Lane B, Jin T, et al. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourin Cancer*. 2007;5:264-270.
- Ishikawa J, Maeda S, Umezawa K, Sugiyama T, Kamidono S. Amplification and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1990;45:1018-1021.
- Ljungberg B, Gafvels M, Damberg JE. Epidermal growth factor receptor gene expression and binding capacity in renal cell carcinoma, in relation to tumor stage, grade and DNA ploidy. *Urol Res*. 1994;22:305-308.
- Hofmockel G, Riess S, Bassukas ID, Dammrich J. Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact. *Eur Urol*. 1997;31:478-484.
- Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, et al. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res*. 1995;1:913-920.
- Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:2445-2459.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982;6:655-663.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:643-655.
- de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, et al. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1387-1392.
- Kanematsu T, Yano S, Uehara H, Bando Y, Sone S. Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Oncol Res*. 2003;13:289-298.
- Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas [serial online]. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R49.
- Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:7389-7397.
- Hammarsten P, Karalija A, Josefsson A, et al. Low levels of phosphorylated epidermal growth factor receptor in nonmalignant and malignant prostate tissue predict favorable outcome in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1245-1255.
- Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, et al. High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. *Neoplasia*. 2004;6:240-247.
- Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, et al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007;56:175-184.
- Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers

- predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1 23:6829-6837, 2005.
25. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, et al. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:880-887.
26. Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2005;23:6838-6845.
27. El-Hariry I, Powles T, Lau MR, et al. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;46:859-862.
28. Jermann M, Stahel RA, Salzberg M, et al. A phase II, open-label study of gefitinib (IRESSA) in patients with locally advanced, metastatic, or relapsed renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57:533-539.
29. Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, et al. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 1 22:3003-3015, 2004.
30. Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Hayakawa M. Modulation of tumor growth and tumor induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2004;171(2 pt 1):897-902.
31. Gordon MS, Hussey M, Nagle RB, et al. Phase II study of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic papillary histology renal cell cancer: SWOG S0317. *J Clin Oncol*. 2009;27:5788-5793.
32. Bukowski RM, Kabbaniavar FF, Figlin RA, et al. Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:4536-4541.
33. Dawson NA, Guo C, Zak R, et al. A phase II trial of gefitinib (Iressa, ZD1839) in stage IV and recurrent renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7812-7819.
34. Sakaeda T, Okamura N, Gotoh A, et al. EGFR mRNA is upregulated, but somatic mutations of the gene are hardly found in renal cell carcinoma in Japanese patients. *Pharm Res*. 2005;22:1757-1761.
35. Szymanska K, Moore LE, Rothman N, et al. TP53, EGFR, and KRAS mutations in relation to VHL inactivation and lifestyle risk factors in renal-cell carcinoma from central and eastern Europe. *Cancer Lett*. 2010;293:92-98.

1.0 Einleitung

Der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) gehört zu der Gruppe der transmembranen Tyrosinkinasen (Chromosom 7p12, 185 kD transmembrane Tyrosinkinase) [1], und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung malignen Zellwachstums. Bei vielen Tumorarten wurde eine erhöhte Expression des EGFRs gefunden und als prognostischer Parameter vorgeschlagen [2]. Der EGFR stellt somit einen wichtigen Angriffspunkt therapeutischer Anti-EGFR-Medikamente dar. EGFR-Expression, EGFR-Genvermehrung und EGFR-Genmutation wurden als mögliche prädiktive Faktoren für die Wirksamkeit einer Anti-EGFR-Therapie vorgeschlagen.

In dieser Studie wurden 1392 Nierenzellkarzinomgewebeproben zu einem Tissue Micro Array (TMA) verarbeitet und mittels Immunhistochemie (IHC), Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) und DNA-Sequenzierung auf DNA- und Proteinebene untersucht, um die Rolle des EGFR bei Nierenzellkarzinomen (renal cell carcinoma, RCC) zu erforschen.

Bisherige Studien zeigten bei immunhistochemischen Färbung von Nierenzellkarzinomen eine erhöhte EGFR-Expression zwischen 50 und 90% [3-8]. Eine relevante Assoziation zwischen EGFR-Expression und Grad oder Stadium des Nierenzellkarzinoms konnte jedoch nicht festgestellt werden [5,9,10]. Die prognostische Bedeutung der Überexpression des EGFR in Nierenzellkarzinomen im Hinblick auf das Überleben wurde bisher kontrovers diskutiert [3,4,7,8,11,12].

Neben der potentiellen prognostischen Relevanz spielt der EGFR eine wichtige Rolle als Angriffspunkt medikamentöser Therapie. Eine Vielzahl von Anti-EGFR-Medikamenten wurde von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen oder wird in klinischen Studien getestet. Diese Medikamente sind kleine inhibitorische Moleküle wie Gefitinib oder Erlotinib, oder Antikörper wie Cetuximab [13]. Die meisten Erfahrungen mit Anti-EGFR-Medikamenten wurden bei der Therapie von Lungen- und Kolonkarzinomen gesammelt. Bei Lungenkarzinompatienten ist die Anzahl der Patienten, die auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen zwar relativ gering, es konnte jedoch ein substantielles Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren bei einigen Patienten mit einer Mutation im EGFR-Gen (Exon 18-21) [14] nachgewiesen werden.

Eine erhöhte Genkopienzahl wurde ebenfalls als prädiktiv für das Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie bei Patienten mit Lungenkarzinomen vorgeschlagen [13].

Um die Bedeutung von EGFR-Alterationen und den potentiellen Nutzen der Anti-EGFR-Therapie bei Nierenzellkarzinomen zu evaluieren, analysierten wir die EGFR-Expression, die Genkopienzahl und das Vorhandensein von Mutationen im Exon 18-21 bei über 1000 Nierenzellkarzinomen, wovon mehr als 700 klinische Verlaufsdaten aufwiesen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Patienten

Zur Herstellung des Tissue Micro Array Blocks wurden 585 paraffinierte Nierenzellkarzinomproben nach Nephrektomie dem Archiv des Pathologischen Instituts des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf entnommen. Hinzu kam eine existierende Sammlung von RCC-Gewebeblöcken (n=503) des Universitätskrankenhauses Basel in der Schweiz. Die Tumoren wurden anhand der TNM-Klassifikation eingeteilt, die Gradierung fand nach Fuhrman et al. [15] statt und die histologische Einteilung nach den Empfehlungen der International Union against Cancer. Da die meisten Tumoren nach Fuhrman gradiert waren, verwandten wir diese 4-stufige Unterteilung für folgende Berechnungen: Grade (n=147), pathologische Tumorklassifikation (pT) (n=2), pathologischer Lymphknotenstatus (pN) (n=577), und klinische Metastasenklassifikation (cM) (n=376). Aus morphologisch repräsentativen Regionen von einzelnen, in Paraffin eingebetteten Nierenzellkarzinomen (Spenderblöcke) wurden Stanzen (Durchmesser 0,6mm) entnommen, und mittels eines eigens entwickelten TMA-Gerätes in einen Paraffinempfängerblock (45mm x 20mm) eingebracht. Eine Stanze wird als Spot bezeichnet. Jeweils fünf Millimeter dünne Scheiben des fertigen TMAs wurden mit Hilfe eines Paraffinschneidesystems (adhäsiv beschichtete Objektträger, (PSA-CS4x), Klebeband, UV-Lampe; Instrumedics Inc, Hackensack, NJ) auf Objektträger transferiert. Klinische Verlaufsdaten waren bei 737 Fällen vorhanden, die entweder dem lokalen Krebsregister (Basel, Schweiz) entnommen oder vom behandelnden Arzt (Hamburg, Deutschland) erhoben wurden. Klinische und

pathologische Charakteristika aller Tumoren beider TMAs sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

2.2 Immunhistochemie

Der frisch geschnittene TMA wurde an einem Tag in einem Ablauf analysiert. Der monoklonale EGFR-Antikörper (Klon 2-18C9; Dako, Hamburg, Deutschland) wurde gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt. Die TMA-Scheiben wurden deparaffinisiert und mit Proteinkinase K für fünf Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Primär gebundene Antikörper wurden mit Hilfe des Pharm DX-Kits (Dako) sichtbar gemacht. Es wurde die Farbintensität der membranösen EGFR-Färbung für jeden einzelnen Gewebespot in 0,+1,+2 oder +3 eingestuft. Spots ohne RCC wurden nicht gezählt.

2.3 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Eine vier μm TMA Sektion wurde mit einer zweifarbigen FISH untersucht. Zunächst wurde eine proteolytische Vorbehandlung mit einem kommerziellen Kit (Paraffin Vorbehandlungskit, Vysis, Downers Grove, IL) vorgenommen. Es wurde eine Spektrum-Orange EGFR Probe und eine Spektrum-Grün Zentromer 7 Probe (PathVysion; Vysis) verwendet. Vor der Hybridisierung mussten die TMAs deparaffinisiert, luftgetrocknet und in 70%, 85% und 100% Ethanol dehydriert werden. Hiernach fünf Minuten bei 74°C in 70% Formamid-2facher Standard Salz-Zitrat-Lösung denaturiert werden, um dann über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer zu hybridisieren. Die Objektträger wurden gewaschen und mit 0.2 μM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gegengefärbt. Für jeden Tumor wurden 20 Zellen gemäss den Leitlinien nach Cappuzzo et al. [16] eingeteilt:

Cappuzzo Leitlinien:

- 1) Disomie (≤ 2 Kopien in > 90% der Zellen)
- 2) Niedrige Trisomie (≤ 2 Kopien in $\geq 40\%$ der Zellen, 3 Kopien in 10%-40% der Zellen, ≥ 4 Kopien in <10% der Zellen)
- 3) Hohe Trisomie (≤ 2 Kopien in $\geq 40\%$ der Zellen, 3 Kopien in $\geq 40\%$ der Zellen, ≥ 4 Kopien in <10% der Zellen)

- 4) Niedrige Polysomie (≥ 4 Kopien in 10% - 40% der Zellen)
- 5) Hohe Polysomie (≥ 4 Kopien in $\geq 40\%$ der Zellen)
- 6) Genamplifikation (definiert durch das Vorhandensein enger EGFR-Gen Cluster und eine EGFR-Gen zu Chromosomen Verteilung von ≥ 2 oder ≥ 15 EGFR-Kopien pro Zelle in $\geq 10\%$ der analysierten Zellen).

2.4 EGFR Mutationsanalyse

Von 63 Tumorproben (51 klarzellige RCCs und 11 chromophobe RCCs) wurde DNA extrahiert. Die Gewebegewinnung wurde mittels "Makrodissektion" mit einem Skalpell durchgeführt, um einen hohen Gehalt ($>80\%$) an Tumorzellen in den Gewebeproben sicherzustellen. Die Genanalyse des EGFR-Gens wurde mit Hilfe von PCR-Amplifikation des Exons 18,19, 20 und 21 mittels subsequenter Sequenzierung der PCR-Produkte exakt nach Protokoll Lynch et al. [14] durchgeführt.

2.5 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit dem JMP Statistik Programm (SAS Institute, Cary, NC) durchgeführt. Für den Vergleich von kategorischen Daten wurden CHI-Test und Fisher's exakt Test verwendet. Überlebenskurven wurden mit Kaplan-Meier Kurven dargestellt und im Log-rank Test verglichen.

3.0 Ergebnisse

3.1 Technische Probleme

Ein Teil der Spots war durch das Fehlen von Gewebeproben oder eindeutiger Krebszellen oder nicht beurteilbarer FISH-Signale nicht auswertbar. Der Prozentsatz nicht interpretierbarer Spots betrug 12,8% für die EGFR IHC und 32,8% für die EGFR FISH.

3.2 Immunhistochemie

Eine positive EGFR-Färbung konnte in 756 (79,7%) von 948 interpretierbaren Nierenzellkarzinomen festgestellt werden. Repräsentative Darstellungen sind in

Abbildung 1a und 1b gezeigt. Die EGFR-Färbung wurde als schwach bei 324 (42,8%), als mäßig bei 301 (39,9%) und als stark bei 131 (17,3%) aller Fälle eingeteilt. Die Frequenz und Intensität der EGFR-Färbung variierte zwischen den verschiedenen Arten von Nierenzellkarzinomen (Tabelle 2). Die EGFR-Expression war bei Klarzelligen Nierenzellkarzinomen am stärksten und Onkozytomen am geringsten. Papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome wiesen eine mittlere EGFR-Expression auf. Bei 711 klarzelligen Karzinomen wurde eine starke Assoziation der EGFR-Expression mit Tumorgrad ($p<0,0001$) und fortgeschrittenem Tumorstadiums ($p<0,0001$) festgestellt. Die pN-Kategorie und cM-Kategorie war signifikant mit der EGFR-Expression assoziiert (Tabelle 3). Zwischen der EGFR-Expression und dem Überleben bei 500 klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurde keine signifikante Assoziation ($p=0,0975$) gefunden. Bei 126 papillären Karzinomen konnte keine klare Assoziation der EGFR-Expression mit klinisch-pathologischen Tumorparametern (Tabelle 4) oder mit dem Überleben ($p=0,8165$) festgestellt werden.

3.3 EGFR FISH

Ein Kollektiv von 731 Nierenzellkarzinomen wurde erfolgreich mittels FISH analysiert und zeigte auswertbare rote EGFR und grüne Zentromer 7 Signale. Nach den Cappuzzo-Kriterien wurden 440 (60,2%) Disomien, 130 (17,8%) niedrige Trisomien, 6 (0,8%) hohe Trisomien, 114 (15,6%) niedrige Polysomien, 40 (5,5%) hohe Polysomien und 1 (0,1%) Amplifikation gefunden. Wenn lediglich die durchschnittliche Genkopienzahl angenommen wurde, fanden wir 410 (56,4%) Tumoren mit $\leq 2,0$ Kopien und 325 (43,6%) der Tumoren mit $> 2,0$ Kopien pro Tumorzelle. Repräsentative Bilder der FISH-Ergebnisse werden in Abbildung 1c und 1d gezeigt. Ein Vergleich der verschiedenen histologischen Tumortypen deckte geringe Unterschiede in der Häufigkeit der Genkopiealterationen in den häufigen klarzelligen, papillären und chromophoben Karzinomen auf. 541 interpretierbare, mittels FISH untersuchte klarzellige Karzinome zeigten einen nur geringen Anstieg der EGFR-Kopienzahl bei ungünstigen klinisch-pathologischen Befunden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p<0,0001$) für Tumorstadium ($p=0,0472$) und Nodalstatus ($p=0,0065$). Eine signifikante Assoziation mit dem Phänotyp konnte nur beim Grading ($p=0,0224$) einer

kleinen Gruppe von 105 FISH-interpretierbaren papillären Karzinomen gefunden werden.

Eine erhöhte EGFR-Kopienzahl war signifikant mit einer gesteigerten EGFR-Proteinexpression assoziiert ($p=0,0015$). Eine starke immunhistochemische EGFR-Anfärbung wurde bei 13% der Nierenzellkarzinome mit zwei oder weniger EGFR-Signalen pro Zelle und bei 21% der Karzinome mit mehr als zwei EGFR-Signalen pro Zelle gefunden. Die für klarzellige Karzinome separat erhobenen Daten werden in Tabelle 5 gezeigt. Jedoch zeigten viele RCCs mit starker EGFR-Expression nur eine geringe Steigerung der EGFR-Genkopienzahl.

3.4 EGFR Mutation

Es wurde bei 63 sequenzierten Nierenzellkarzinomproben keine Mutation im Exon 18 bis 21 gefunden.

4.0 Diskussion

Wir beobachteten in dieser Studie bei 79,6% der interpretierbaren Nierenzellkarzinome eine EGFR-Expression. Obwohl die Gewebeproben nur einen Durchmesser von 0,6mm vorwiesen, ist unser Ergebnis im Rahmen vorheriger Studien. Diese beschrieben typischerweise eine EGFR-Positivität bei ca. 70% der Nierenzellkarzinome, mit einer Spannweite von 47% [7] bis 93,2% [8]. Daten aktueller Studien zeigen, dass Frequenz und Intensität der EGFR-Expression stark vom histologischen Tumortyp abhängen. Klarzellige Karzinome zeigen häufiger mäßige oder stark positive Ergebnisse als papilläre oder chromophobe Karzinome. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen Uhlman et al. [12] überein, welcher eine EGFR-Positivität von 73% in soliden Tumoren, jedoch nur 21% in papillären Karzinomen beschrieb. Moch et al. [6] beobachtete eine EGFR-Positivität in 40% der papillären Karzinome im Vergleich zu 81% bei klarzelligen Karzinomen. Eine besonders niedrige EGFR-Positivität wurde in Onkozytomen gefunden. Obwohl es schwierig ist, Forschungsergebnisse die durch TMA Analyse erworben wurden, in die Klinik zu transferieren, besteht jedoch die Möglichkeit, dass die EGFR-Expressionsanalyse in der oft schwierigen Unterscheidung

von Onkozytomen und chromophoben Karzinomen helfen könnte. Die besonders hohe Frequenz der EGFR-Überexpression bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen könnte durch den bei klarzelligen RCCs sehr häufigen Funktionsverlust des von-Hippel-Lindau-Gens (VHL-Gen) verursacht worden sein. Es wurde nachgewiesen, dass der Funktionsverlust des VHL-Gens zur Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) und somit zu Faktor-alpha Expression und autokrinem EGFR-Signal führt [17]. Dies kann eine EGFR-Überexpression ohne Anstieg der EGFR-Genkopienzahl zur Folge haben.

Die Analyse des Zusammenhangs von EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Daten wurde für die einzelnen histologischen Tumorentitäten separat durchgeführt. Dies ist nötig, da zahlreiche Studien substantielle biologische Unterschiede zwischen histologisch definierten Nierenzellkarzinomen beschreiben. Diese Unterschiede werden auch durch variable EGFR-Expressionskalen bekräftigt. Nur klarzellige Karzinome und papilläre Karzinome – die grösste “Tumorgruppe” – wurden daher bezüglich Assoziation zu klinischen und pathologischen Parametern analysiert. Eine besonders deutliche Assoziation fand sich zwischen histologischem Tumograd und EGFR-Überexpression bei klarzelligen Karzinomen. Dies spricht für eine Rolle des EGFR für die Dedifferenzierung von Tumoren. Auch für andere Tumorarten wurde eine positive Assoziation zwischen EGFR-Expression und histologischen Tumortyp beschrieben [3,12].

Trotz der signifikanten Assoziation mit ungünstigen Tumormerkmalen wurde keine signifikante Assoziation zwischen der EGFR-Expression und dem Überleben in unseren 500 klarzelligen Nierenkarzinomen mit klinischen Verlaufsdaten gefunden. Einige Autoren vermuteten im Vorfeld eine Verbindung zwischen EGFR-Expression und verkürztem Überleben bei kleinen Sammlungen gemischter Nierenzellkarzinome. Merseburger et al. [7] beobachtete eine signifikante Assoziation mit der Prognose in 149 Nierenzelltumoren, Stumm et al. [3] bei 34 Tumoren und Uhlmann et al. [12] bei 175 Tumoren. Insgesamt argumentieren die vorhandenen Daten für eine signifikante, aber nicht sehr starke Assoziation der EGFR-Expression mit ungünstigem Phänotyp und schlechter Prognose bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

Vorherige Studien schlugen einen Aktivationsstatus des EGFR vor, welcher sich durch eine Phosphorylierung definiert, und einen stärkeren Einfluss auf die Klinik hat, als die

EGFR-Überexpression. Kanematsu et al. [18] beobachtete, dass eine Phosphorylierung des EGFR, nicht die Überexpression, mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit nicht-kleinzeligem Lungenkarzinom einherging. Die Korrelation zwischen EGFR-Phosphorylierung und schlechtem Outcome wurde auch bei Mammakarzinomen [19], Zervixkarzinomen [20] und Prostatakarzinomen [21] nachgewiesen.

Die TMA Methode ist besonders hilfreich, um Genkopienzahlen mit Proteinexpression zu vergleichen, da immer identische Tumorareale analysiert werden. Dies schliesst einen möglichen Einfluss der Tumorheterogenität aus. Die signifikante Assoziation der EGFR-Genkopienzahl mit der EGFR-Proteinexpression bekräftigt den starken Einfluss von sogar geringen DNA-Kopienzahl-Veränderungen auf die EGFR-Genexpression. Dies steht im Einklang mit zahlreichen Studien, die CGH Array und RNA-Expressions Screening Daten [22] vergleichen. Hierbei wurde regelmässig bei den meisten Genen die auf DNA-Ebene leicht überrepräsentiert waren eine signifikante RNA-Überexpression gefunden [23]. Immer mehr Studien halten eine prädiktive Rolle der minimalen EGFR-Genkopienzahl für die Wirksamkeit von Anti-EGFR Medikamenten bei Lungen- und Hirntumoren für möglich [16, 24-26]. Die Verwendung ähnlicher Kriterien zur EGFR-Genkopienzahl-Kategorisierung wie in einer Lungenkarzinomstudie, die eine Assoziation zwischen Kopierzahl und Ansprechen auf Tyrosinkinasehemmer gefunden hatte, ergaben in 5,6% der Nierenzellkarzinome eine hohe Polysomie/Amplifikation. Dieser simultane Anstieg von Zentromer 7 Kopien und EGFR in praktisch allen Studien deutet darauf hin, dass eine Chromosomen 7 Polysomie (des gesamten Chromosomens) der häufigste Grund für einen Anstieg der EGFR-Genkopienzahl darstellt. Vorherige Studien zeigten eine EGFR-Amplifikation bei Nierenzellkarzinomen in 0,6% [27] und 4,5% [9] der Fälle. Diese FISH-Daten deuten darauf hin, dass ein Teil der Nierenzellkarzinompatienten auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen könnte. Nur wenige Studien haben bisher die Möglichkeiten einer Anti-EGFR-Therapie bei Nierenzellkarzinomen untersucht [28-33]. Insgesamt bestehen bisher keine starken Hinweise auf die Wirksamkeit dieser Medikamente bei Nierenzellkarzinompatienten. Die genannten Studien wählten ihre Patienten jedoch nicht nach dem Vorhandensein von EGFR-Genkopienzahl oder ähnlichem aus.

Das Vorliegen von EGFR-Mutationen im Exon 18-21 ist der stärkste Prädiktor der möglichen Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren bei Lungenkarzinomen. Das

Nichtvorhandensein von Mutationen bei unseren 63 Nierenzellkarzinomproben stimmt mit den bisherig vorhandenen Studienergebnissen überein. Bei Lynch et al. [14] wurden bei 16 Nierenzellkarzinomen, bei Sakaeda et al. [34] bei 19 Nierenzellkarzinomen und bei Szymanska et al. [35] bei 50 Nierenzellkarzinomen keine Mutation im EGFR-Gen nachgewiesen.

Zusammenfassend können wir sagen, dass eine gesteigerte EGFR-Expression häufig bei Nierenzellkarzinomen vorkommt und schwach mit einem ungünstigem Phänotyp assoziiert ist. Eine hochgradige EGFR-Expression kann durch eine EGFR-Polysomie verursacht werden, was bei ungefähr 5% der Tumoren nachgewiesen wurde. Bei Lungenkarzinompatienten ist dies mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf Tyrosinkinaseinhibitoren assoziiert, Daten zu Nierenzellkarzinompatienten sind noch nicht erhältlich. Eine EGFR-Genmutation, der stärkste Prädiktor für eine Mögliche Antwort auf Tyrosinkinaseinhibitoren, konnte bei unseren 60 analysierten Nierenzellkarzinomen nicht nachgewiesen werden.

5.0 Zusammenfassung

Der Epidermal Growth Factor Receptor gehört zu der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren. Eine erhöhte EGFR-Expression gilt bei manchen Tumoren als Prognosemarker und stellt somit einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt dar. Eine Vielzahl von Anti-EGFR-Medikamenten (Gefitinib, Erlotinib) werden im Rahmen klinischer Studien getestet, wobei die Ansprechraten bei unselektierten Kohorten relativ niedrig ist. Mögliche prädiktive Faktoren für eine Anti-EGFR-Therapie sind erhöhte EGFR-Expression, EGFR-Genvermehrung und EGFR-Genmutation. Um die Rolle des EGFR bei Nierenzellkarzinomen zu erforschen, haben wir 1392 RCCs auf DNA- und Proteinebene untersucht. Es wurden Gewebeproben von jedem Tumor zu einem Tissue Micro Array verarbeitet und immunhistochemisch, sowie mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung analysiert. Zusätzlich wurden 60 Tumoren auf Mutationen des EGFR-Exons 18 bis 21 mit Hilfe von DNA-Sequenzierung untersucht. Bei 83,8% des klarzelligen RCCs, 68,2% des papillären RCCs, 75% des chromophoben RCCs und

50% in Onkozytomen wurde durch immunhistochemische Anfärbung eine EGFR-Expression nachgewiesen. Klarzellige RCCs wiesen eine signifikante Assoziation der EGFR-Expression mit hohem Tumorgrad ($p<0,0001$), fortgeschrittenem Tumorstadium ($p=0,0001$), und zu einem geringeren Teil mit positivem Nodalstatus ($p=0,0326$) auf. Die FISH Analyse zeigte eine relevant erhöhte Anzahl der EGFR-Kopien (hohe Polysomie) in 5,5% und Amplifikationen in 0,1% der Fälle. Die EGFR-Kopienanzahl korellierte mit der EGFR-Proteinexpression ($p<0,0015$). Bei klarzelligen RCCs war eine hohe Kopienzahl mit einem hohen Tumorgrad ($p<0,0001$), fortgeschrittener pathologischer Tumorklassifikation ($p=0,0472$) und positivem Nodalstatus ($p=0,0065$) assoziiert. Es wurde keine Mutation des EGFR-Gens in 60 sequenzierten Tumorproben gefunden. Wir schliessen aus unseren Daten, dass die erhöhte EGFR-Expression in einigen RCCs mit einem ungünstigen histologischen Phänotyp einhergeht. Der Anstieg der EGFR-Kopienzahl könnte eine mögliche Ursache der EGFR-Überexpression sein, jedoch weisen viele überexprimierende Tumoren einen normalen Genotyp auf. Eine hohe Polysomie (die als Prädiktor für das Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren gilt) trat in 5,6% der RCCs auf. Es besteht die Möglichkeit, dass eine weitere Erforschung der Anti-EGFR-Therapie einer kleinen aber signifikanten Gruppe von Patienten mit Nierenzellkarzinomen von Nutzen sein könnte.

6.0 Abbildungen und Tabellen

6.1. Abbildungen

Fig. 1

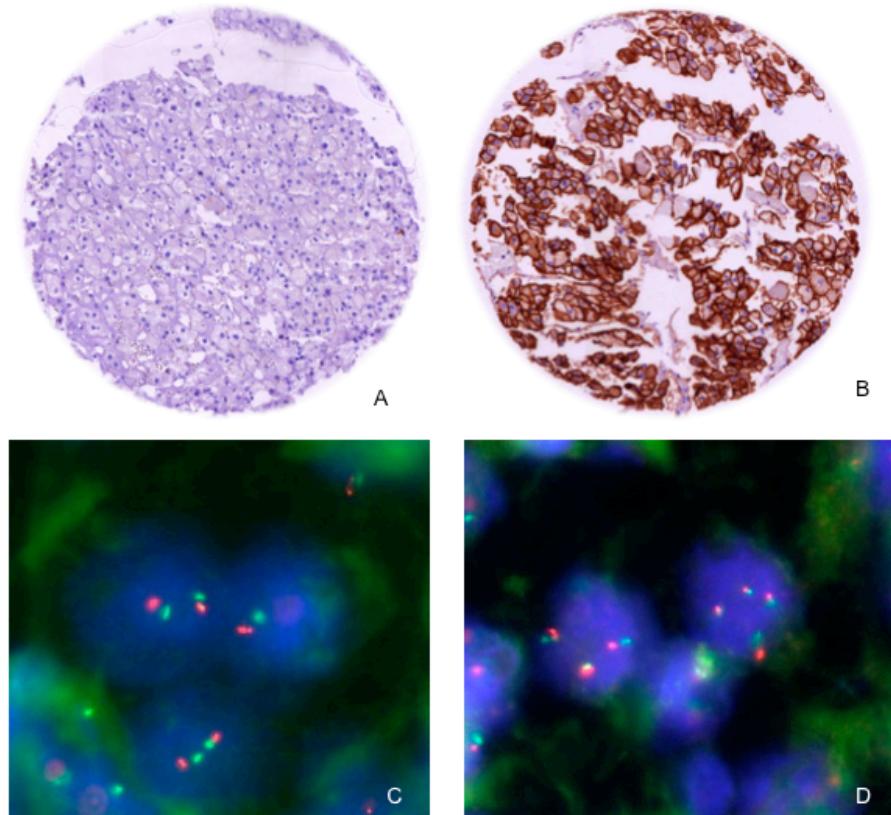


Fig. 1: Repräsentative Abbildung der membranösen EGFR-Färbung (IHC) und FISH.

- EGFR IHC negativ in klarzelligen Nierenzellkarzinomen
- EGFR IHC 3+ in einem klarzelligen Nierenzellkarzinom
- Klarzelliges Nierenzellkarzinom mit Disomie. Die meisten Zellen zeigen zwei rote EGFR Signale und zwei grüne Zentromer 7 Signale.
- Klarzelliges Nierenzellkarzinom mit Polysomie. Die Abbildung zeigt zwei Tumorzellen mit drei grünen Zentromer 7 Signalen und drei roten EGFR Signalen

6.2 Tabellen

Tabelle 1: Patientencharakteristika bei 1034 Fällen mit Nierenzellkarzinom

	Variable	n Fälle
pT Kategorie	pT1	467
	pT2	154
	≥pT3	411
pN Kategorie	pN0	388
	pN+	69
Fernmetastasen	cM0	508
	cM1	150
Grade (Fuhrman)	G1	160
	G2	387
	G3	239
	G4	101
Follow-up (Monate)	Mean	53
	Median	35

Tabelle 2: Frequenz und Intensität der EGFR-Immunanfärbung verschiedener Tumortypen

EGFR Intensität	0 (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)
klarzelliges RCC (n=711)	16,2	32,5	35,4	15,9
chromophobes RCC (N=32)	25,0	43,8	12,5	18,7
papilläres RCC (n=126)	31,8	35,7	27,0	5,5
Oncocytome (n=50)	50,0	44,0	4,0	2,0

p<0,0001

Tabelle 3: Assoziation der EGFR-Immunanfärbung mit klinisch-pathologischen Merkmalen bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Variable	Intensität der EGFR Anfärbung				P-Wert
	0(%)	+1(%)	+2(%)	+3(%)	
Tumor Stadium					
pT1(n=308)	14,6	36,7	39,3	9,4	
pT2(n=90)	20,0	36,7	32,2	11,1	<0,0001
pT3(n=296)	17,6	27,4	32,7	22,3	
pT4(n=9)	0	22,2	22,2	55,6	
Grade (Fuhrman)					
G1(n=117)	6,9	44,4	43,6	5,1	
G2(n=271)	17,0	32,8	36,2	14,0	<0,0001
G3(n=167)	22,2	31,1	28,1	18,6	
G4(n=86)	19,8	19,8	36,0	24,4	
Nodal Stadium					
pN0(n=258)	9,3	36,1	36,8	17,8	
pN1(n=48)	25,0	25,0	31,2	18,8	0,0326
Metastasen					
cM0(n=342)	17,3	34,5	34,5	13,7	
cM1(n=117)	12,8	23,9	37,6	25,7	0,0101

Tabelle 4: Assoziation der EGFR-Immunanfärbung mit klinisch-pathologischen Merkmalen bei papillären Nierenzellkarzinomen

Variable	Intensität der EGFR Anfärbung				P-Wert
	0(%)	+1(%)	+2(%)	+3(%)	
Tumor Stadium					
pT1(n=62)	37,1	38,7	24,2	0	
pT2(n=30)	20,0	40,0	26,7	13,3	0,0493
pT3(n=30)	36,7	23,3	30,0	10,0	
pT4(n=1)	0	0	100	0	
Grade (Fuhrman)					
G1(n=14)	21,4	42,9	28,6	7,1	
G2(n=55)	30,9	34,6	30,9	3,6	0,2527
G3(n=36)	41,7	36,1	13,9	8,3	
G4(n=4)	25,0	0	75	0	
Nodal Stadium					
pN0(n=50)	32	30	32	6	
pN1(n=1)	33,3	0	44,5	22,2	0,0695
Metastasen					
M0(n=56)	32,1	42,9	19,6	5,4	
cM1(n=7)	28,6	28,6	42,8	0	0,5126

Tabelle 5: Assoziation der Veränderung der EGFR-Kopienanzahl mit EGFR-Immunanfärbung bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen

	EGFR Kopienzahl ≤ 2 (%)	EGFR Kopienzahl >2 (%)	P-Wert
EGFR Int 0 (n=80)	9,3	12,0	
EGFR Int 1+ (n=247)	37,6	26,9	
EGFR Int 2+ (n=302)	40,1	39,8	0,0015
EGFR Int 3+ (n=127)	13,0	21,2	

7.0 Literaturverzeichnis

1. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:127-137.
2. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:341-354.
3. Stumm G, Eberwein S, Rostock-Wolf S, et al. Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis. *Int J Cancer.* 1996; 69:17-22.
4. Moch H, Sauter G, Buchholz N, et al.. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 1997;28:1255-1259.
5. Amare Kadam PS, Varghese C, Bharde SH, et al.. Proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor (EGFr) status in renal cell carcinoma patients with polysomy of chromosome 7. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;125:139-146.
6. Moch H, Sauter G, Gasser TC, et al.. EGF-r gene copy number changes in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *J Pathol.* 1998; 184:424-4299.
7. Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, et al.. Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer. *Anticancer Res.* 2005; 25:1901-1907.
8. Cohen D, Lane B, Jin T, et al.. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourin Cancer.* 2007;5:264-270.
9. Ishikawa J, Maeda S, Umez K, Sugiyama T, Kamidono S. Amplification and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1990;45:1018-1021.
10. Ljungberg B, Gafvels M, Damberg JE. Epidermal growth factor receptor gene expression and binding capacity in renal cell carcinoma, in relation to tumor stage, grade and DNA ploidy. *Urol Res.* 1994;22:305-308.
11. Hofmockel G, Riess S, Bassukas ID, Dammrich J. Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact. *Eur Urol.* 1997;31:478-484.
12. Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, et al.. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res.* 1995;1:913-920.
13. Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:2445-2459.
14. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129-2139.
15. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982;6:655-663.

16. **Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al.** Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst.** 2005;97:643-655.
17. **de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, et al.** Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL) (-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2001;98:1387-1392.
18. **Kanematsu T, Yano S, Uchara H, Bando Y, Sone S.** Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non small cell lung cancer patients. **Oncol Res.** 2003;13:289-298.
19. **Magkou C, Nakopoulou I, Zoubouli C, et al.** Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas (serials online). **Breast Cancer Res.** 2008;10:R49.
20. **Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, et al.** Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. **Clin Cancer Res.** 2009;15:7389-7397.
21. **Hammarsten P, Karalija A, Josefsson A, et al.** Low levels of phosphorylated epidermal growth factor receptor in nonmalignant and malignant prostate tissue predict favorable outcome in prostate cancer patients. **Clin Cancer Res.** 2010;16:1245-1255.
22. **Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, et al.** High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. **Neoplasia.** 2004;6:240-247.
23. **Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, et al.** Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer.** 2007;56:175-184.
24. **Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, et al.** Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol.** 2005;23:6829-6837.
25. **Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, et al.** Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. **J Natl Cancer Inst.** 2005;97:880-887.
26. **Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al.** Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. **J Clin Oncol.** 2005;23:6838-6845.
27. **El-Hariry I, Powles T, Lau MR, et al.** Amplification of epidermal growth factor receptor gene in renal cell carcinoma. **Eur J Cancer.** 2010;46:859-862.
28. **Jermann M, Stahel RA, Salzberg M, et al.** A phase II, open-label study of gefitinib (IRESSA) in patients with locally advanced, metastatic, or relapsed renal-cell carcinoma. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2006;57:533-539.
29. **Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, et al.** Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. **J Clin Oncol.** 2004;22:3003-3015.

30. **Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Hayakawa M.** *Modulation of tumor growth and tumor induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 in renal cell carcinoma.* **J Urol.** **2004;171:897-902.**
31. **Gordon MS, Hussey M, Nagle RB, et al.** *Phase II study of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic papillary histology renal cell cancer: SWOG S0317.* **J Clin Oncol.** **2009;27:5788-5793.**
32. **Bukowski RM, Kabbinavar FF, Figlin RA, et al.** *Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer.* **J Clin Oncol.** **2007;25:4536-4541.**
33. **Dawson NA, Guo C, Zak R, et al.** *A phase II trial of gefitinib (Iressa, ZD1839) in stage IV and recurrent renal cell carcinoma.* **Clin Cancer Res.** **2004;10:7812-7819.**
34. **Sakaeda T, Okamura N, Gotoh A, et al.** *EGFR mRNA is upregulated, but somatic mutations of the gene are hardly found in renal cell carcinoma in Japanese patients.* **Pharm Res.** **2005;22:1757-1761.**
35. **Szymanska K, Moore LE, Rothman N, et al.** *TP53, EGFR, and KRAS mutations in relation to VHL inactivation and lifestyle risk factors in renal-cell carcinoma from central and eastern Europe.* **Cancer Lett.** **2010;293:92-98.**

Danksagung

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. med. G. Sauter , Dr. Minner und Prof. Dr. Bokemeyer für die immer freundliche Betreuung und Unterstützung danken.

Auch möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich durch Ratschläge und Diskussionen sowie durch ihre Motivation im Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht genutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

07.12.2011, Cork Irland

Dorothea Angelika Rump