

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Professor Dr. med. Guido Sauter

FGFR1 Amplifikationen weisen eine häufig homogene Verteilung beim Ösophaguskarzinom auf und sind assoziiert mit Plattenepithelkarzinomen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jule Kröger (geb. Kohlhaussen)
aus Marburg

Hamburg 2017

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.09.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Disputation: 20.09.2017

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Tobias Lange

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. Oliver Mann

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation der Originalarbeit (S. 1-14)	4
2. Darstellung der Publikation	18
<i>2.1 Einleitung</i>	<i>18</i>
<i>2.2 Material und Methoden</i>	<i>20</i>
<i>2.3 Ergebnisse</i>	<i>21</i>
<i>2.4 Diskussion</i>	<i>21</i>
<i>2.5 Zusammenfassung</i>	<i>25</i>
<i>2.6 Abstract</i>	<i>26</i>
<i>2.7 Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>27</i>
<i>2.8 Literaturverzeichnis</i>	<i>28</i>
3. Eigenanteil an der Publikation	31
4. Danksagung	32
5. Lebenslauf	33
6. Eidesstattliche Versicherung	34

RESEARCH ARTICLE

FGFR1 Amplification Is Often Homogeneous and Strongly Linked to the Squamous Cell Carcinoma Subtype in Esophageal Carcinoma

Katharina von Loga^{*‡}, Jule Kohlhaussen[‡], Lia Burkhardt, Ronald Simon, Stefan Steurer, Susanne Burdak-Rothkamm, Frank Jacobsen, Guido Sauter, Till Krech

Department of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[‡] These authors contributed equally to this work.

* kvonloga@uke.de



Abstract

Background and Aims

Amplification of the *fibroblast growth factor receptor 1* (*FGFR1*) is believed to predict response to multi-kinase inhibitors targeting *FGFR1*. Esophageal cancer is an aggressive disease, for which novel targeted therapies are highly warranted.

Methods

This study was designed to investigate the prevalence and clinical significance of *FGFR1* amplification in a tissue microarray containing 346 adenocarcinomas and 254 squamous cell carcinomas of the esophagus, using dual-labeling fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis.

Results

FGFR1 amplification, defined as a ratio of *FGFR1*:centromere 8 copy numbers ≥ 2.0 , was more frequently seen in squamous cell carcinoma (8.9% of 202 interpretable cases) than in adenocarcinoma (1.6% of 308; $p < 0.0001$). There was no association between *FGFR1* amplification and tumor phenotype or clinical outcome. To study potential heterogeneity of *FGFR1* amplification, all available tumor blocks from 23 *FGFR1* amplified tumors were analyzed on conventional large sections. This analysis revealed complete homogeneity of *FGFR1* amplification in 20 (86.9%) primary tumors and in all available lymph node metastases. Remarkably, *FGFR1* amplification was also seen in dysplasia adjacent to tumor in 6 of 9 patients with *FGFR1* amplified primary cancers.

Conclusions

In conclusion, *FGFR1* amplification occurs in a relevant subgroup of carcinomas of the esophagus and may play a particular role for development of squamous cell cancers. The

OPEN ACCESS

Citation: von Loga K, Kohlhaussen J, Burkhardt L, Simon R, Steurer S, Burdak-Rothkamm S, et al. (2015) *FGFR1* Amplification Is Often Homogeneous and Strongly Linked to the Squamous Cell Carcinoma Subtype in Esophageal Carcinoma. PLoS ONE 10(11): e0141867. doi:10.1371/journal.pone.0141867

Editor: Amit Dutt, Advanced Centre for Treatment, Research and Education in Cancer, Tata Memorial Center, INDIA

Received: July 23, 2015

Accepted: October 14, 2015

Published: November 10, 2015

Copyright: © 2015 von Loga et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

high homogeneity of *FGFR1* amplification suggests that patients with *FGFR1* amplified esophageal cancers may particularly benefit from anti-*FGFR1* therapies and prompt for clinical studies in this tumor type.

Introduction

Esophageal cancer is an aggressive disease presenting with two histologically and genetically distinct subtypes, i.e. adeno- and squamous cell carcinoma (EADC and ESCC). Patients with esophageal neoplasias are usually diagnosed at advanced stages [1,2] and, thus, have a generally poor prognosis with 5-year survival rates typically not extending 10–25% (URL: <http://www.cancer.org>) [1,3]. Because curative therapy options in patients with advanced disease are lacking, there is an urgent need for novel and effective drugs.

Targeted cancer therapies have successfully entered clinical routine in several tumor types. Particularly growth factor receptors, such as *HER2*, *EGFR*, *VEGFR* or *c-KIT*, which are strongly up regulated in many cancers, have proven to represent efficient anti-cancer therapy targets [4–10]. There is growing evidence that targeting of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) holds promising clinical potential [11,12]. FGFR1 plays an important role in cell differentiation and growth by downstream signaling to the nucleus involving either the Ras/MAPK- or PI3/Akt-pathways [13,14]. An important mechanism of oncogenic FGFR1 activation is amplification of its gene locus at chromosome 8p11, which is found in 10–20% of squamous cell carcinomas of the lung [15–18], in about 10% of hormone receptor positive breast carcinoma [19–21], 10–17% head and neck squamous cell carcinomas [22] and 6% of small cell carcinomas of the lung [23]. Little is known about the clinical significance of *FGFR1* amplification in esophageal cancer or about possible differences between histological subtypes. Reported *FGFR1* amplification frequencies in studies on 32–189 esophageal cancers range between 6–21% in squamous cell cancers [24,25] and 9% in adenocarcinomas [25], but the impact on patient prognosis is largely unknown. Only one study on Asian ESCC patients suggested that *FGFR1* amplification might be linked to poor outcome [26].

To better understand the prognostic role of *FGFR1* amplification in Caucasian patients, we employed fluorescence in-situ hybridization (FISH) analysis for precise determination of the *FGFR1* amplification rate in a large tissue microarray made from 254 ESCC and 346 EADC patients with histopathological and clinical follow-up data of Caucasian origin.

Material and Methods

Esophageal cancer TMA

The esophageal cancer TMA utilized for this study consists of 600 formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples including 346 esophageal adenocarcinomas and 254 esophageal squamous cell carcinomas, and was extended based on an earlier TMA containing 292 cancers [27]. All patients had undergone surgery between 1992–2011 at the surgical department of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. The female to male ratio in our cancers was 117 to 483, which corresponds to the observed incidence of these tumor types [28,29]. Two pathologists (KVL, TK) reviewed all tumor slides. All work has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration. The general usage of archived diagnostic left-over tissues for manufacturing of tissue microarrays (TMAs) and their analysis for research purposes as well as patient data analysis has been approved by the local ethics committee (Ethics commission Hamburg, WF-049/09 and PV3652). The authors KVL and FJ acted as the treating physicians/

pathologists and had access to identifying patient information at the time point when the tissues were collected but not at the time point when the study was conducted. The tissues were collected during routine cancer surgery. All tissues had been collected and used for TMA manufacturing prior to this study. The ethics committee reviewed and approved the lack of consent procedure.

The TMA manufacturing process was described earlier in detail [30]. In short, one 0.6 mm core was taken from a representative tissue block from each patient. Tissue sample were distributed on two TMA blocks, containing 346 and 254 cancer cores, respectively. In addition, both blocks comprise tissue controls of normal esophageal epithelium. Tumor grade and stage were defined according to the International Union Against Cancer (UICC) and the WHO [3,31]. Clinical data of patients were retrospectively evaluated. The medium follow-up period was 27, 7 months (range 0–215 months). An overview of all histological and clinical data is given in Table 1.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

A dual color FISH probe set was used for *FGFR1* amplification analysis. The probe set combined a home-made spectrum green labeled *FGFR1* probe (chromosome 8 locus 8p 11.22–23, made from bacterial artificial chromosome (BAC) clone RP11-350N15) and a commercial

Table 1. Esophageal Carcinoma—Array.

		ESCC (n = 254)	EADC (n = 346)
Gender	female	69	48
	male	185	298
Tumor	pT1a	16	33
	pT1b	34	49
	pT2	49	36
	pT3	139	206
	pT4a	6	18
	pT4b	10	4
Nodal	pNX	9	8
	pN0	116	107
	pN1	56	63
	pN2	48	80
	pN3	25	88
Metastasis	pM0	206	307
	pM1	48	39
Grade	G1	4	26
	G2	164	125
	G3	86	189
	G4	0	6
UICC	IA	40	71
	IB	24	12
	IIA	46	29
	IIB	13	14
	IIIA	35	57
	IIIB	26	54
	IIIC	22	72
	IV	48	37

doi:10.1371/journal.pone.0141867.t001

spectrum red labeled probe for the centromeric region of chromosome 8 (Zytovision, Bremerhaven, Germany). Freshly cut TMA sections (4 micrometer thick) were deparaffinized and proteolytically pretreated using a commercial kit (Zytolight FISH-Tissue Implementation Kit, Zytovision, Bremerhaven, Germany), followed by dehydration in 70%, 90% and 99% ethanol, air drying and codenaturation in a Thermobrite hybridization oven (Abbott, Chicago, USA) for 10 minutes at 75°Celsius. Hybridization was overnight at 37°Celsius. Slides were then washed and counterstained with 0, 2 micromol/l of DAPI.

Scoring of FISH signals

Presence of tumor cells was verified in each spot by comparison of a hematoxylin and eosin (H&E) stained adjacent reference section of the TMA. Two experienced technicians (SS, SE) estimated the predominant gene and centromere copy numbers in at least 20 non-overlapping tumor cells in each tissue spot. Data from our laboratory have previously shown that diagnosis of amplification based on signal number estimation is highly reliable [32,33].

High-level FGFR1 amplification was defined as presence of ≥ 10 FGFR1 gene signals or an *FGFR1*/centromere 8 ratio of ≥ 3.0 . Tumors with a ratio of ≥ 2.0 but < 3.0 were considered low-level amplification. All other cancers were considered non-amplified. These included cancers with normal (two) copies of *FGFR1* and centromere 8, cancers with polyploidy of chromosome 8 (ratio > 0.8 but < 1.2 and more than two *FGFR1* copies) as well as cancers with an *FGFR1* copy number gain not reaching the threshold for amplification (ratio ≥ 1.2 but < 2.0). Examples of tumor spots with and without *FGFR1* amplification are shown in Fig 1 (Fig 1).

Large section validation

To estimate the degree of intratumoral heterogeneity of *FGFR1* amplification, all available primary and metastasis tumor blocks of all cancers showing *FGFR1* amplification according to the TMA analysis, including 18 ESCC and 5 EADC, were analyzed for amplification on conventional large sections (4 μ m thickness). The number of *FGFR1* and centromere 8 FISH signals were counted in at least 20 non-overlapping cell nuclei, and the average *FGFR1* and centromere 8 copy numbers were calculated per sample. The *FGFR1*:centromere 8 ratio was calculated from these values. High-level and low-level *FGFR1* amplification was defined as described above. Heterogeneity was defined as presence of *FGFR1* non-amplified and amplified tumor areas within the same cancer (Fig 1B). If present, adjacent dysplasia was also evaluated.

For comparison of FGFR1 expression levels in tumors with and without *FGFR1* amplification, tissue blocks containing 70% or more tumor cells were selected that had been used for TMA manufacturing before. For RNA isolation, one 0.6 mm tissue core was taken from each tumor block. The deparaffinized and air-dried cores were grinded in liquid nitrogen before total RNA was isolated using a commercial kit (RNeasy FFPE kit #744044, QIAGEN) following the manufacturers instructions except for prolonged (overnight) proteinase digestion. cDNA was synthesized from 0.5 to 1 mg total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems #4368814). Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) was carried out in duplicate using combinations of primer pairs and TaqMan probes targeting mRNA sequences of FGFR1 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Primers were obtained from Applied Biosystems (Darmstadt). The GAPDH gene served as an internal control for the normalization of FGFR1 RT-PCR products. The PCR program included a 10 minute denaturation at 95°C followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, and 1 minute at 60°C. Relative quantification results were calculated according to the DDCT method [34].

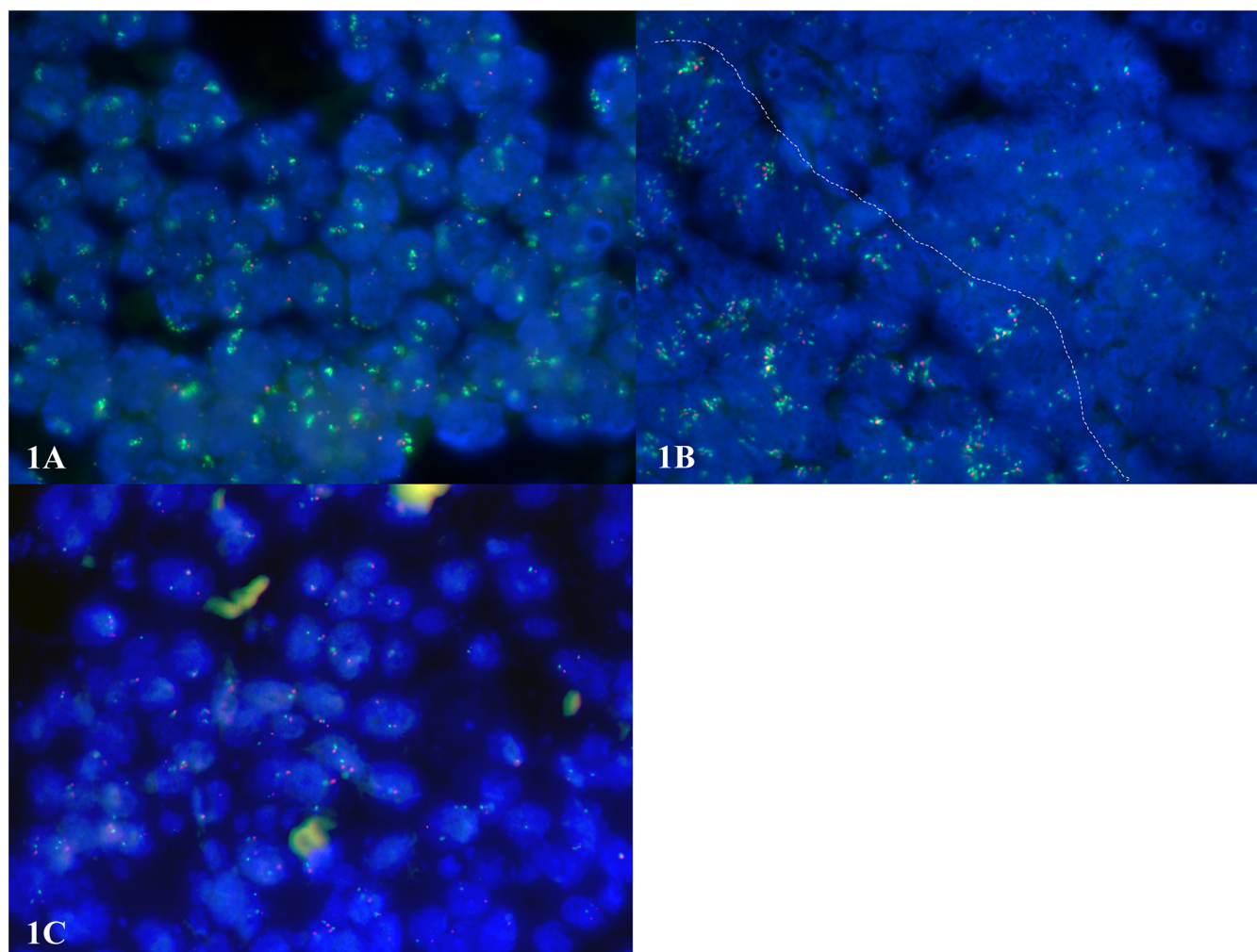


Fig 1. FISH analysis in ESCC patients. Green signals represent the *FGFR1* gene while red signals correspond to the centromere of chromosome 8. (A) high-level amplification of *FGFR1* showing 10–20 gene signals and 2–4 centromere signals with a ratio of 6.16. (B) Heterogeneous amplification of *FGFR1* as indicated by presence of two distinct cancer areas with *FGFR1* amplification and without *FGFR1* amplification. These two areas are separated by the dotted line. (C) Normal *FGFR1* gene and centromere 8 signals.

doi:10.1371/journal.pone.0141867.g001

Statistical analysis

Statistical calculations were performed using SAS[®] JMP (version 9.0) statistical software. To compare categorical variables such as grade, stage and molecular features, contingency tables were calculated applying chi²-test and Fisher's exact tests. Survival curves were calculated according to the Kaplan-Meier method and compared with the Logrank test. Cox regression was used to assess independency of molecular, morphological and clinical parameters to predict patient survival.

Results

Technical aspects

FISH analysis was successful in 510 of 600 (85%) arrayed tumors including 202 squamous cell carcinomas and 308 adenocarcinomas. Analysis failures were either due to insufficient

hybridization efficiency or issues connected to the TMA technology, such as missing samples or absence of unequivocal cancer cells in a tissue spot.

Prevalence of *FGFR1* amplifications and their association to esophageal cancer phenotype and patient prognosis

Low- and high-level *FGFR1* amplifications were significantly more frequent in ESCC (18 of 202, 8.9%) than in EADC (5 of 308, 1.6%, $p < 0.0001$). *FGFR1* amplification was typically high-level according to our predefined criteria: 67% (12 of 18) *FGFR1*-amplified ESCC, and 80% (4 of 5) *FGFR1*-amplified EADC showed high-level amplification. Due to these strong differences in amplification frequencies between squamous cell- and adenocarcinomas, associations to phenotype and clinical outcome were calculated separately in each subgroup. All results are summarized in [Table 2](#). These analyses did not reveal significant associations between *FGFR1* amplification and tumor phenotype or clinical outcome, neither in the subset of 202 ESCC, nor in the subset of 308 EADC ([Fig 2](#)). A total of 21 squamous cell carcinomas and 4 adenocarcinomas harbored *FGFR1* copy number increases that did not reach the predefined threshold for amplification, including 15 cancers with polyploidy of chromosome 8 (15 ESCC) and 10 cancers with *FGFR1* gains (6 ESCC and 4 EADC). The results of these cases are shown in [S1 Table](#).

Heterogeneity analysis

All 23 amplified cancers were further analyzed in order to assess the level of homogeneity/heterogeneity of *FGFR1* amplifications. Data are summarized in [Table 3](#). Overall, *FGFR1* amplification was homogenous in 20 (86.9%) and heterogeneous in 3 (13.0%) amplified cancers. All available lymph node metastasis ($n = 7$) showed a homogeneous amplification pattern, even in one case with heterogeneous amplification of the primary tumor. Remarkably, *FGFR1* amplification was also observed in 6 of 8 patients (75%) where areas of dysplastic squamous epithelium were found adjacent to invasive cancer.

Association between *FGFR1* gene amplification and mRNA expression

mRNA expression results were retained from 8 of 10 *FGFR1* amplified and *FGFR1* non-amplified each. The average mRNA expression level was 14919.4 in *FGFR1* amplified as compared to 5485.8 in *FGFR1* non-amplified ($p = 0.1869$). Of note, most *FGFR1* amplified cancers had expression levels that were in the range of *FGFR1* non-amplified samples. Highest expression levels were found in two amplified samples harboring 9.35 and 35.55 *FGFR1* gene copies according to FISH analysis ([Fig 3](#)).

Discussion

Our data demonstrate marked differences in the prevalence of *FGFR1* gene amplification between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of esophageal carcinomas.

In this study, we employed FISH analysis for *FGFR1* gene copy analysis. FISH is regarded as the most precise means for gene copy number measurement in histological sections, because it is not disturbed by the presence of non-cancerous cells in the tissue samples. Previous studies on Caucasian ESCC employing the less quantitative CGH analysis reported 6–21% *FGFR1* amplifications in cohorts of 32 and 70 ESCC [24,25]. However, our finding of 8.9% *FGFR1* amplification in ESCC is almost identical to a recent FISH study on Asian ESCC, reporting 8.6% amplification using the same threshold (ratio ≥ 2.0) for amplification [26]. Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>) on esophageal carcinomas (September 2015) indicate *FGFR1* amplification in 11.1% of 45 squamous cell carcinomas

Table 2. *FGFR1* amplification in ESCC and EADC.

		ESCC				EADC					
		n	all ampl. (%)	low ampl. (%)	high ampl. (%)	p-value	n	all ampl. (%)	low ampl. (%)	high ampl. (%)	p-value
all cancers		202	18 (8.9)	6 (3.0)	12 (5.9)		308	5 (1.6)	1 (0.3)	4 (1.3)	
Gender	female	53	4 (7.5)	1 (1.9)	3 (5.7)	0.8357	41	1 (2.4)	0	1 (2.4)	0.733
	male	149	14 (9.4)	5 (3.4)	9 (6.0)		267	4 (1.5)	1 (0.4)	3 (1.1)	
Tumor	pT1a	9	1 (11.1)	0	1 (11.1)	0.6832	29	0	0	0	0.9748
	pT1b	27	3 (11.1)	0	3 (11.1)		44	1 (2.3)	0	1 (2.3)	
	pT2	38	4 (10.5)	2 (5.3)	2 (5.3)		27	1 (3.7)	0	1 (3.7)	
	pT3	116	9 (7.8)	4 (3.4)	5 (4.3)		188	3 (1.6)	1 (0.5)	2 (1.1)	
	pT4a	5	1 (20.0)	0	1 (20.0)		16	0	0	0	
	pT4b	7	0	0	0		4	0	0	0	
	pNX	4	0	0	0		8	0	0	0	
Nodal	pN0	95	8 (8.4)	3 (3.2)	5 (5.3)	0.7451	96	3 (3.1)	0	3 (3.1)	0.2219
	pN1	45	4 (8.9)	1 (2.2)	3 (6.7)		54	0	0	0	
	pN2	41	5 (12.2)	1 (2.4)	4 (9.8)		71	1 (1.4)	0	1 (1.4)	
	pN3	17	1 (5.9)	1 (5.9)	0		79	1 (1.3)	1 (1.3)	0	
	pM0	165	12 (7.3)	4 (2.4)	8 (4.8)		273	5 (1.8)	1 (0.4)	4 (1.5)	
Metastasis	pM1	37	6 (16.2)	2 (5.4)	4 (10.8)	0.2525	35	0	0	0	0.5543
	Grade	G1	3	0	0		0	23	0	0	
Grade	G2	136	13 (9.6)	4 (2.9)	9 (6.6)	0.9308	111	0	0	0	0.2528
	G3	63	5 (7.9)	2 (3.2)	3 (4.8)		174	5 (2.9)	1 (0.6)	4 (2.3)	
	UICC	IA	28	2 (7.1)	0		2 (7.1)	63	1 (1.6)	0	
UICC	IB	22	1 (4.5)	0	1 (4.5)	0.4709	11	1 (9.1)	0	1 (9.1)	0.6935
	IIA	40	4 (10.0)	2 (5.0)	2 (5.0)		28	1 (3.6)	0	1 (3.6)	
	IIB	9	2 (22.2)	1 (11.1)	1 (11.1)		10	0	0	0	
	IIIA	27	0	0	0		50	0	0	0	
	IIIB	25	2 (8.0)	1 (4.0)	1 (4.0)		49	1 (2.0)	0	1 (2.0)	
	IIIC	14	1 (7.1)	0	1 (7.1)		63	1 (1.6)	1 (1.6)	0	
	IV	37	6 (16.2)	2 (5.4)	4 (10.8)		34	0	0	0	

doi:10.1371/journal.pone.0141867.t002

with data on copy number alterations, which is also well in line with 8.9% in our study. That no *FGFR1* amplification was reported in 25 adenocarcinomas further supports the concept of marked differences in the *FGFR1* amplification frequencies between these two histological subtypes. TCGA data, moreover, suggest that *FGFR1* mutations are rare events (< 2%) in this tumor type. It is, therefore, likely that the putative oncogenic function of amplified *FGFR1* is typically mediated by the wild type gene.

Comparison of *FGFR1* mRNA expression levels in a small set of *FGFR1* amplified and non-amplified cancers revealed a wide range of expression levels in both subgroups. An overall high *FGFR1* expression level in amplified cancers was mainly driven by two *FGFR1* amplified cancer with particularly high mRNA expression levels. These findings suggest that gene amplification is one important mechanism for *FGFR1* overexpression but also indicates that other mechanisms can lead to a significant up-regulation of *FGFR1* expression.

We found a striking predominance of *FGFR1* amplification in squamous cell cancers (8.9%) as compared to adenocarcinomas (1.6%) in our study on 510 esophageal cancers. A higher prevalence of *FGFR1* amplification in ESCC as compared to EADC had also been suggested in

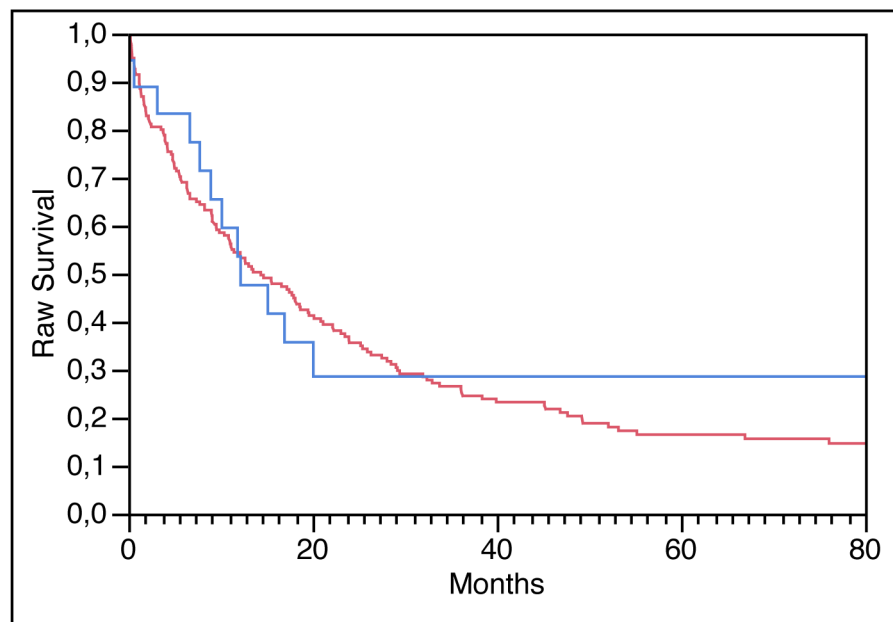


Fig 2. Raw Survival of ESCC patients. Red line: no *FGFR1* amplified tumor patients. Blue line: *FGFR1* amplified tumor patients.

doi:10.1371/journal.pone.0141867.g002

a previous study comparing 70 ESCC and 189 EADC [25]. In addition, differences in the *FGFR1* amplification rate between squamous cell carcinoma and adenocarcinomas has also been reported from cancers of the lungs [35,36]. These findings suggest a particular role of *FGFR1* activation for the development of a squamous cell phenotype. It is possible, that this finding is linked to specific mutagenic agents such as cigarette smoke. It is well known that squamous cell cancers of the esophagus and lungs are linked to smoking [37–39]. Differences in the amplification frequency between ESCC and EADC have also been reported from other genes, including *SOX2*, *PIK3CA*, *MYC*, *CCND1*, which had a higher amplification frequency in ESCC, and *GATA4* as well as *GATA6*, which had a higher amplification frequency in EADC [25]. Of note, many of these genes are transcription factors. It is, thus, tempting to speculate that amplification and overexpression of these genes results in activation of specific genetic programs that favor development of the one or the other histological subtype of esophageal carcinomas. In fact, amplification of *GATA4* and *GATA6* is often found in adenocarcinomas from other origins [25,40].

An early role of *FGFR1* activation for squamous cell phenotype development is supported by our analysis of ESCC precursor lesions. It can be expected that molecular events arising before or during malignant transformation should be present in all cancer cells of the resulting tumor bulk. We found *FGFR1* amplification in six of eight samples of squamous cell dysplasia adjacent to *FGFR1* amplified cancers, and 15 of 18 *FGFR1* amplified ESCC showed homogeneous amplification. These findings, despite the low number of cases, might suggest that *FGFR1* amplification is an early event in ESCC. A tumor-initiating role of *FGFR1* is also supported by studies from other cancer types. For example, *FGFR1* amplification was found in in-situ carcinomas and low-grade ER positive breast cancers [41,42] and in early stage lung cancers [35].

Only recently, *FGFR1* has gained considerable interest as a target for gene specific therapies. A multitude of selective and non-selective small molecule inhibitors targeting *FGFR1* and

Table 3. Homogeneity/Heterogeneity analysis of *FGFR1* amplified tumors.

N°	Sub-type	Age	Gender	pT	pN	pM	G	UICC	FGFR1 in the PT				FGFR1 in the LN			PT	LN	Dys
									FGFR1 gene*	Cen 8*	FGFR1 Ratio	Homo/Hetero**	FGFR1 gene*	Cen 8*	FGFR1 Ratio			
1	ESCC	76	m	1b	1	1	2	IV	35.55	3.35	10.6	homogeneous				Ampl, high		Ampl
2	ESCC	62	m	1b	2	1	2	IV	35.5 + 3.2	4.1 + 3.15	8.55 + 1.02	heterogeneous	21.25	3.05	6.97	Ampl, high	Ampl	
3	ESCC	71	m	2	1	0	2	IIB	17.25	2.8	6.16	homogeneous	19.5	2.15	9.07	Ampl, high	Ampl	Ampl
4	ESCC	53	m	3	2	1	3	IV	15.2	2.3	6.61	homogeneous	9.25	2.35	3.94	Ampl, high	Ampl	
5	ESCC	71	m	3	1	1	2	IV	14.3	2.75	5.20	homogeneous				Ampl, high		
6	ESCC	53	m	3	0	0	2	IIA	14.0	2.35	5.96	homogeneous				Ampl, high		
7	ESCC	56	m	3	0	0	3	IIA	10.85	4.25	2.55	homogeneous				Ampl, high		
8	ESCC	53	f	4a	2	0	3	IIIC	10.45	3.2	3.27	homogeneous	9.05	3.2	2.83	Ampl, high	Ampl	Ampl
9	ESCC	52	m	2	0	0	2	IB	10.3	3.1	3.32	homogeneous				Ampl, high		
10	ESCC	61	f	3	2	0	2	IIIB	9.5	2.5	3.80	homogeneous	5.75	2.1	2.74	Ampl, high	Ampl	no Ampl
11	ESCC	60	f	1b	0	0	2	IA	8.4	2.45	3.43	homogeneous				Ampl, high		Ampl
12	ESCC	70	m	1a	0	0	2	IA	6.7	2.05	3.27	homogeneous				Ampl, high		Ampl
13	ESCC	47	m	2	0	1	2	IV	7.6 + 3.4	2.7 + 2.95	2.76 + 1.15	heterogeneous				Ampl, low		
14	ESCC	66	m	3	0	0	2	IIA	6.3 + 2.55	2.3 + 2.25	2.74 + 1.13	heterogeneous				Ampl, low		no Ampl
15	ESCC	71	m	3	2	0	3	IIIB	9.5	4.0	2.38	homogeneous	12.25	2.4	5.10	Ampl, low	Ampl	Ampl
16	ESCC	42	m	2	1	0	3	IIB	9.35	3.5	2.67	homogeneous	11.05	4.5	2.46	Ampl, low	Ampl	
17	ESCC	62	m	3	3	1	2	IV	5.15	2.3	2.24	homogeneous				Ampl, low		
18	ESCC	67	f	3	0	0	2	IIA	5.05	2.0	2.53	homogeneous				Ampl, low		
19	EADC	62	f	3	0	0	3	IIA	30.75	5.05	6.09	homogeneous				Ampl, high		
20	EADC	60	m	3	2	0	3	IIIB	18.5	5.35	3.46	homogeneous				Ampl, high		
21	EADC	56	m	2	0	0	3	IB	9.85	3.0	3.28	homogeneous				Ampl, high		
22	EADC	80	m	1b	0	0	3	IA	8.63	2.38	3.63	homogeneous				Ampl, high		
23	EADC	73	m	3	3	0	3	IIIC	6.25	2.85	2.19	homogeneous				Ampl, low		

*average copy number counted in 20 cell nuclei,

**Homogeneity/Heterogeneity, PT: primary tumor, LN: lymph node, Dys: dysplasia

doi:10.1371/journal.pone.0141867.t003

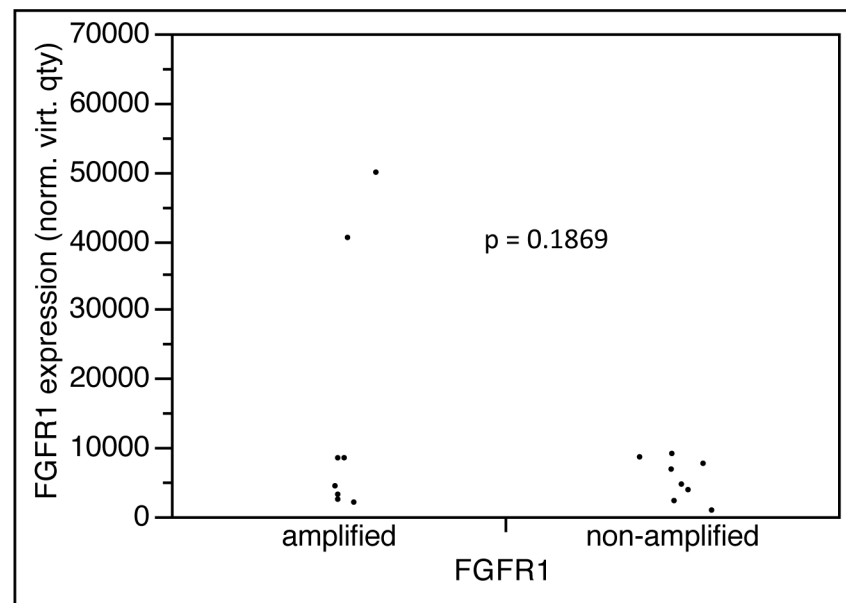


Fig 3. FGFR1 expression.

doi:10.1371/journal.pone.0141867.g003

related tyrosine kinases are currently under investigation in preclinical and clinical trials, including the non-selective inhibitors dovitinib, Ki23057, and ponatinib, and the highly selective inhibitors AZD4547 and BGJ398. Preclinical studies have demonstrated the efficacy of AZD4547 and BGJ398 on *FGFR* gene—amplified cancers both in cell line and mouse models [43–47]. In a phase II clinical trial (NCT01795768), AZD4547 showed therapeutic efficacy as a second-line treatment in patients with *FGFR1*- and *FGFR2*-amplified breast cancer, squamous cell carcinoma of the lung, or gastro-esophageal adenocarcinoma. In addition, one pre-clinical study suggests that such treatment may also hold promise for esophageal cancer [48]. The lack of relevant intratumoral heterogeneity of *FGFR1* amplifications in our study suggests that anti-FGFR1 therapies may be effective in esophageal cancers harboring this alteration, and encourages future clinical trials in *FGFR1* amplified ESCC.

FGFR1 amplification was unrelated to tumor stage, grade, lymph node metastasis and clinical outcome in the 202 esophagus squamous cell carcinomas analyzed in this study. Additional data on the clinical relevance of *FGFR1* alterations in ESCC are only available from Asian patients. Two studies on 526 Korean and 79 Japanese patients report associations between *FGFR1* amplification [26] and immunohistochemical overexpression [49] and shortened overall survival. It is possible that ethnic differences between Caucasian and Asian patients might account for the discrepant findings. Such ethnic differences have been described for various relevant molecular cancer features, including *HER2* amplification in breast cancer [50], *TMPRSS2-ERG* gene fusion in prostate cancer [51], and *MET* mutation in lung cancer [52].

In this study, a tissue microarray composed from a single 0.6 mm punch per tissue sample was used. We have previously shown that using multiple cores (e.g. 3 cores per tissue spot) does not necessarily increase the ability to identify associations of biomarkers with tumor phenotype and prognosis but has always the disadvantage of additional work and tissue requirements [53]. Using multiple cores can be useful to increase the number of analyzable cancers but can lead to statistical problems if unequal amounts of tissue are analyzed per tumor. In fact, there is a large number of studies using TMAs with one 0.6 mm cores that confirm the known prognostic relevance of virtually all previously established clinically useful biomarkers,

for instance, between alterations of HER2 [54] or p53 [55] and survival in breast cancer, between vimentin expression and prognosis in kidney cancer [56], and even between heterogeneous markers such as Ki67 labeling index and prognosis in urinary bladder cancer [57], breast cancer [58] and prostate cancer [53].

Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) on 70 esophageal carcinomas (45 ESCC and 25 EADC) suggest that *FGFR1* mutations are rare events (< 2%) in this tumor type. It is, therefore, likely that the putative oncogenic function of *FGFR1* is typically mediated by the wild type gene.

In summary, the results of our study provide strong evidence that *FGFR1* amplification is an early molecular event linked to the squamous cell subtype of esophageal cancers. The high homogeneity and high level of *FGFR1* amplification argues for FGFR1 representing a promising drug target in ESCC.

Supporting Information

S1 Table. *FGFR1* gene copy number alterations. Legend S1. Polyploidy: ratio >0.8 but <1.2 and more than two *FGFR1* copies, Gain: ratio ≥ 1.2 but < 2.0. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KVL JK RS GS TK. Performed the experiments: KVL LB JK RS TK. Analyzed the data: KVL JK RS LB SS FJ SBR TK. Contributed reagents/materials/analysis tools: KVL JK RS TK. Wrote the paper: KVL JK RS TK.

References

1. Zhang Y (2013) Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 19: 5598–5606. doi: [10.3748/wjg.v19.i34.5598](https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i34.5598) PMID: [24039351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24039351/)
2. Worn M, Castleberry AW, Gloor B, Pietrobon R, Haney JC, et al. (2014) Trends and outcomes in the use of surgery and radiation for the treatment of locally advanced esophageal cancer: a propensity score adjusted analysis of the surveillance, epidemiology, and end results registry from 1998 to 2008. *Dis Esophagus* 27: 662–669. doi: [10.1111/dote.12123](https://doi.org/10.1111/dote.12123) PMID: [23937253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23937253/)
3. Bosman FT, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. (2010) WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 417 p. p.
4. Yu Q, Zhu Z, Liu Y, Zhang J, Li K (2015) Efficacy and Safety of HER2-Targeted Agents for Breast Cancer with HER2-Overexpression: A Network Meta-Analysis. *PLoS One* 10: e0127404. doi: [10.1371/journal.pone.0127404](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127404) PMID: [25993646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25993646/)
5. Murphy CG, Morris PG (2012) Recent advances in novel targeted therapies for HER2-positive breast cancer. *Anticancer Drugs* 23: 765–776. PMID: [22824822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22824822/)
6. Health Quality O (2010) Epidermal Growth Factor Receptor Mutation (EGFR) Testing for Prediction of Response to EGFR-Targeting Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Drugs in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: An Evidence-Based Analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* 10: 1–48.
7. Delaney C, Frank S, Huang RS (2015) Pharmacogenomics of EGFR-targeted therapies in non-small cell lung cancer: EGFR and beyond. *Chin J Cancer* 34: 7.
8. Ashman LK, Griffith R (2013) Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 22: 103–115. doi: [10.1517/13543784.2013.740010](https://doi.org/10.1517/13543784.2013.740010) PMID: [23127174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23127174/)
9. Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 9 Suppl 1: 2–10. PMID: [15178810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15178810/)
10. Ellis LM, Hicklin DJ (2008) Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res* 14: 6371–6375. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-07-5287](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5287) PMID: [18927275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18927275/)

11. Chang J, Liu X, Wang S, Zhang Z, Wu Z, et al. (2014) Prognostic value of FGFR gene amplification in patients with different types of cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9: e105524. doi: [10.1371/journal.pone.0105524](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105524) PMID: [25171497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25171497/)
12. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, et al. (2014) Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol* 25: 552–563. doi: [10.1093/annonc/mdt419](https://doi.org/10.1093/annonc/mdt419) PMID: [24265351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24265351/)
13. Goke F, Franzen A, Menon R, Goltz D, Kirsten R, et al. (2012) Rationale for treatment of metastatic squamous cell carcinoma of the lung using fibroblast growth factor receptor inhibitors. *Chest* 142: 1020–1026. PMID: [22499828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22499828/)
14. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7: 165–197. PMID: [11021964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11021964/)
15. Jiang T, Gao G, Fan G, Li M, Zhou C (2015) FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 87: 1–7. doi: [10.1016/j.lungcan.2014.11.009](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.11.009) PMID: [25433983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25433983/)
16. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, et al. (2010) Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2: 62ra93. doi: [10.1126/scitranslmed.3001451](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001451) PMID: [21160078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21160078/)
17. Heist RS, Mino-Kenudson M, Sequist LV, Tammireddy S, Morrissey L, et al. (2012) FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 7: 1775–1780. PMID: [23154548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23154548/)
18. Schildhaus HU, Heukamp LC, Merkelbach-Bruse S, Riesner K, Schmitz K, et al. (2012) Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 25: 1473–1480. doi: [10.1038/modpathol.2012.102](https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.102) PMID: [22684217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22684217/)
19. Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, et al. (1997) Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res* 57: 4360–4367. PMID: [9331099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9331099/)
20. Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, Lambros MB, Jones C, et al. (2006) FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 12: 6652–6662. PMID: [17121884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17121884/)
21. Brunello E, Brunelli M, Bogina G, Calio A, Manfrin E, et al. (2012) FGFR-1 amplification in metastatic lymph-nodal and haematogenous lobular breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 103. doi: [10.1186/1756-9966-31-103](https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-103) PMID: [23270564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23270564/)
22. Freier K, Schwaenen C, Sticht C, Flechtenmacher C, Muhling J, et al. (2007) Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncol* 43: 60–66. PMID: [16807070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16807070/)
23. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, et al. (2012) Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet* 44: 1104–1110. doi: [10.1038/ng.2396](https://doi.org/10.1038/ng.2396) PMID: [22941188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22941188/)
24. Ishizuka T, Tanabe C, Sakamoto H, Aoyagi K, Maekawa M, et al. (2002) Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 152–155. PMID: [12147242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147242/)
25. Bandla S, Pennathur A, Luketich JD, Beer DG, Lin L, et al. (2012) Comparative genomics of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 93: 1101–1106. doi: [10.1016/j.athoracsur.2012.01.064](https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.01.064) PMID: [22450065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22450065/)
26. Kim HS, Lee SE, Bae YS, Kim DJ, Lee CG, et al. (2015) Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival in patients with resected esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 6: 2562–2572. PMID: [25537505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25537505/)
27. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis M, Quaas A, Link BC, et al. (2007) Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* 20: 120–129. PMID: [17143264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17143264/)
28. Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D (2015) Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut* 64: 381–387. doi: [10.1136/gutjnl-2014-308124](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308124) PMID: [25320104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25320104/)
29. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, et al. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65: 87–108. doi: [10.3322/caac.21262](https://doi.org/10.3322/caac.21262) PMID: [25651787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25651787/)
30. Mirlacher M, Simon R (2010) Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol* 664: 37–44. doi: [10.1007/978-1-60761-806-5_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-806-5_4) PMID: [20690050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20690050/)
31. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer. (2010) TNM classification of malignant tumours. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. xx, 309 p. p.

32. Grob TJ, Hoenig T, Clauditz TS, Atanackovic D, Koenig AM, et al. (2013) Frequent intratumoral heterogeneity of EGFR gene copy gain in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 79: 221–227. doi: [10.1016/j.lungcan.2012.11.009](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.11.009) PMID: [23238037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23238037/)
33. Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, et al. (2001) Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93: 1141–1146. PMID: [11481385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11481385/)
34. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408. PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
35. Cihoric N, Savic S, Schneider S, Ackermann I, Bichsel-Naef M, et al. (2014) Prognostic role of FGFR1 amplification in early-stage non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 110: 2914–2922. doi: [10.1038/bjc.2014.229](https://doi.org/10.1038/bjc.2014.229) PMID: [24853178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24853178/)
36. Preusser M, Berghoff AS, Berger W, Ilhan-Mutlu A, Dinhof C, et al. (2014) High rate of FGFR1 amplifications in brain metastases of squamous and non-squamous lung cancer. *Lung Cancer* 83: 83–89. doi: [10.1016/j.lungcan.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.10.004) PMID: [24183471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24183471/)
37. Lubin JH, Cook MB, Pandeya N, Vaughan TL, Abnet CC, et al. (2012) The importance of exposure rate on odds ratios by cigarette smoking and alcohol consumption for esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Cancer Epidemiol* 36: 306–316. doi: [10.1016/j.canep.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.03.001) PMID: [22504051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22504051/)
38. Seo AN, Jin Y, Lee HJ, Sun PL, Kim H, et al. (2014) FGFR1 amplification is associated with poor prognosis and smoking in non-small-cell lung cancer. *Virchows Arch* 465: 547–558. doi: [10.1007/s00428-014-1634-2](https://doi.org/10.1007/s00428-014-1634-2) PMID: [25086725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25086725/)
39. Kim HR, Kim DJ, Kang DR, Lee JG, Lim SM, et al. (2013) Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31: 731–737. doi: [10.1200/JCO.2012.43.8622](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.8622) PMID: [23182986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23182986/)
40. Lin L, Aggarwal S, Glover TW, Orringer MB, Hanash S, et al. (2000) A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene. *Cancer Res* 60: 1341–1347. PMID: [10728696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10728696/)
41. Brady N, Chuntova P, Bade LK, Schwertfeger KL (2013) The FGF/FGFR axis as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 8: 391–402. PMID: [25400686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25400686/)
42. Welm BE, Freeman KW, Chen M, Contreras A, Spencer DM, et al. (2002) Inducible dimerization of FGFR1: development of a mouse model to analyze progressive transformation of the mammary gland. *J Cell Biol* 157: 703–714. PMID: [12011115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12011115/)
43. Goke F, Franzen A, Hinz TK, Marek LA, Yoon P, et al. (2015) FGFR1 expression levels predict BGJ398-sensitivity of FGFR1-dependent head and neck squamous cell cancers. *Clin Cancer Res*
44. Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, Thomas AP, Al-Kadhimi K, et al. (2012) AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res* 72: 2045–2056. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-11-3034](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3034) PMID: [22369928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22369928/)
45. Zhang J, Zhang L, Su X, Li M, Xie L, et al. (2012) Translating the therapeutic potential of AZD4547 in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer through the use of patient-derived tumor xenograft models. *Clin Cancer Res* 18: 6658–6667. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-12-2694](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2694) PMID: [23082000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23082000/)
46. Guagnano V, Kauffmann A, Wohrle S, Stamm C, Ito M, et al. (2012) FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2: 1118–1133. doi: [10.1158/2159-8290.CD-12-0210](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0210) PMID: [23002168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23002168/)
47. Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, et al. (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: 7066–7083. doi: [10.1021/jm2006222](https://doi.org/10.1021/jm2006222) PMID: [21936542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21936542/)
48. Saito S, Morishima K, Ui T, Hoshino H, Matsubara D, et al. (2015) The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibroblast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 15: 82. doi: [10.1186/s12885-015-1065-8](https://doi.org/10.1186/s12885-015-1065-8) PMID: [25884729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25884729/)
49. Sugiura K, Ozawa S, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M (2007) Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 17: 557–564. PMID: [17273733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17273733/)
50. Al-Kuraya K, Schraml P, Sheikh S, Amr S, Torhorst J, et al. (2005) Predominance of high-grade pathway in breast cancer development of Middle East women. *Mod Pathol* 18: 891–897. PMID: [15803183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15803183/)
51. Farrell J, Petrovics G, McLeod DG, Srivastava S (2013) Genetic and molecular differences in prostate carcinogenesis between African American and Caucasian American men. *Int J Mol Sci* 14: 15510–15531. doi: [10.3390/ijms140815510](https://doi.org/10.3390/ijms140815510) PMID: [23892597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23892597/)

52. Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS, Loganathan S, Liu W, et al. (2009) Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res* 15: 5714–5723. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-09-0070](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0070) PMID: [19723643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19723643/)
53. Tennstedt P, Koster P, Bruchmann A, Mirlacher M, Haese A, et al. (2012) The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol* 40: 261–268. doi: [10.3892/ijo.2011.1216](https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1216) PMID: [21956230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21956230/)
54. Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, et al. (2000) Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 92: 1252–1259. PMID: [10922410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10922410/)
55. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, et al. (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249–2256. PMID: [11733374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11733374/)
56. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, et al. (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154: 981–986. PMID: [10233835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10233835/)
57. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, et al. (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194: 349–357. PMID: [11439368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11439368/)
58. Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, et al. (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118: 2190–2194. PMID: [16331604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16331604/)

2. Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Ösophaguskarzinom

Karzinome der Speiseröhre gehören zu den seltenen malignen Tumorerkrankungen und haben häufig einen lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf. Im Jahr 2012 traten in Deutschland 9,0 Neuerkrankung pro 100.000 Männern und 2,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen auf [2]. Männer erkranken somit 4 bis 5 mal häufiger an einem Ösophaguskarzinom als Frauen [2]. Allerdings steigt die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms seit dem Jahr 2000 in Deutschland in der Gruppe der Frauen leicht an, während die Inzidenz in der Gruppe der Männern annähernd gleichbleibend ist [2]. Grund dafür könnten Veränderungen in der Lebensweise sein.

Das Ösophaguskarzinom wird in erster Linie in die zwei histologischen bzw. genetischen Untergruppen der Plattenepithelkarzinome (esophageal squamous cell carcinoma = ESCC) und der Adenokarzinome (esophageal adenocarcinoma = EADC) unterschieden [1]. Das in Deutschland häufigere ESCC kann zwar in allen Bereichen der Speiseröhre vorkommen, tritt aber vor allem im mittleren Teil der Speiseröhre auf [1]. Bekannte Risikofaktoren sind unter anderem Alkohol- und Nikotinkonsum [1]. Das EADC entsteht hauptsächlich im distalen Teil der Speiseröhre und kann vor allem mit Risikofaktoren wie Adipositas und der chronisch gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) in Verbindung gebracht werden [1]. Unabhängig vom histologischen Typ werden Ösophaguskarzinome nach den TNM Stadien der Union for International Cancer Control (UICC) klassifiziert. Hier werden die Ausdehnung des Tumors (T) und das Vorhandensein von lymphogenen Metastasen (N) und Fernmetastasen (M) angegeben [1]. Das prätherapeutische Stadium ist in der Mehrheit der Ösophaguskarzinome fortgeschritten (T3-4, N+) [4]. Nur etwa jedes siebte Karzinom wird in einem Frühstadium (T1) diagnostiziert [2]. Aus diesem Grund ist die Prognose bei Vorliegen eines Ösophaguskarzinoms oft sehr schlecht. Dies spiegelt sich auch in der geringen relativen 5-Jahresüberlebensrate von 22% bei Männern und 24% bei Frauen wider [2]. Ziel der Forschung ist daher zum einen die Verbesserung der diagnostischen Maßnahmen und zum anderen die Identifizierung neuer und besser wirksamer therapeutischer Möglichkeiten.

Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)

Eine therapeutische Möglichkeit stellt die Verwendung zielgerichteter Gentherapien dar, welche bereits im klinischen Alltag bei verschiedenen Tumorentitäten erfolgreich angewendet werden. Vor allem Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie z.B. Her2 oder EGFR, welche bei Karzinomen häufig überexprimiert werden, sind effiziente Ziele in der Anti-Gentherapie.

FGFR1 zählt ebenfalls zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Durch die extrazelluläre Bindung von Liganden wird FGFR1 aktiviert. Dies führt wiederum zur Induktion der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK-) - Kaskade oder der Phosphatidylinositid-3-Kinase/Protein-Kinase B (PI3K/AKT) Signalkaskade, welche zur Regulation der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums dienen. Aufgrund von molekularen Veränderungen kann es zu einer gesteigerten, in anderen Fällen zu einer permanenten Aktivierung des Rezeptors kommen. Dies resultiert in einem unkontrollierten und

überschießenden Zellwachstum. Eine onkogene Wirkung von FGFR1 ergibt sich zum Beispiel durch die Amplifikation des FGFR1 Genlokus auf Chromosom 8q11. Amplifikationen von FGFR1 wurden bereits in anderen Karzinomerkrankungen gefunden, z.B. in ca. 10% der hormonpositiven Mammakarzinome [5-7], in 10-20% der Plattenepithelkarzinome der Lunge [8-11], in 10-17% der Kopf und Hals Plattenepithelkarzinome [12], sowie in 6% der Kleinzellkarzinome der Lunge [13].

Über die Häufigkeit und klinische Relevanz der FGFR1 Amplifikationen beim Ösophaguskarzinom und dessen potentielle Assoziation zu einem der beiden histologischen Typen ist jedoch nur wenig bekannt. Zwei frühere Studien an 32 und 70 ESCC, sowie 189 EADC zeigen eine starke Variation in der beschriebenen Häufigkeit der FGFR1 Amplifikationen von 6-21% bei ESCC [14,15] und 9% bei EADC [15]. Nur eine einzige Studie bei asiatischen ESCC Patienten deutet außerdem an, dass FGFR1 Amplifikationen mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert sein könnten [16].

Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die prognostische Rolle der FGFR1 Amplifikation bei kaukasischen Patienten zu klären. Dazu wurde der FGFR1 Kopiezahlstatus mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) an 254 ESCC und 346 EADC Tumoren im Gewebemikroarray-Format bestimmt. Die Ergebnisse wurden dann sowohl mit histopathologischen Parametern als auch mit dem klinischen Verlauf verglichen.

2.2 Material und Methoden

Patientenkollektiv

Die für diese Studie verwendeten Gewebeproben stammen von Patienten der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikum Eppendorf (UKE), welche in der Zeit von 1992-2011 eine operative Therapie bei Vorliegen eines Ösophaguskarzinoms erhielten. Insgesamt bestand das Kollektiv aus 600 Karzinom-Patienten, von denen 346 an einem Plattenepithelkarzinom und 254 an einem Adenokarzinom erkrankt waren. Der Anteil weiblicher und männlicher Patienten entsprach mit 19,5% (n=117) und 80,5% (n=483) in etwa der Verteilung der Ösophaguskarzinom-Erkrankungen in Deutschland [2]. Differenzierungsgrad und Stadium der Karzinome wurden nach den Richtlinien der International Union Against Cancer (UICC) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert. Die klinischen Verlaufsdaten wurden retrospektiv evaluiert. Im Mittel konnten diese für einen Zeitraum von 27,7 Monaten (Bereich: 1-215 Monate) erhoben werden.

Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA)

Für die Studie wurden zwei TMAs hergestellt, welche 346 Adenokarzinome bzw. 254 Plattenepithelkarzinome enthielten. Zur Herstellung der TMAs wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte der Gewebeblocks aller Patienten beurteilt und die Areale mit einem hohen Tumorgehalt ($\geq 70\%$ Tumorzellen) gekennzeichnet. Aus diesen Bereichen wurde pro Patient eine 0,6 mm durchmessende Gewebestanze entnommen und in einen TMA-Block übertragen. Als Kontrollgewebe wurde normales Ösophagusgewebe verwendet, welches ebenfalls in das TMA-Format übertragen wurde.

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Zur Bestimmung des FGFR1 Kopiezahlstatus mittels FISH wurden zwei direkt gelabelte DNA-Sonden (FISH-Sonden) verwendet. Die erste, selbst hergestellte grün-gelabelte FISH-Sonde markierte Lokus-spezifisch das Gen FGFR1 (Chromosom 8 Lokus 8p 11.22-23). Die zweite FISH-Sonde markierte das Zentromer des Chromosoms 8 (rot) und diente als Referenz. In jedem Gewebespot wurde von mindestens 20 nicht überlappenden Tumorzellkernen die Anzahl an FGFR1-Signalen und Zentromer 8 Signalen bestimmt. Dann wurde das Verhältnis von den FGFR1-Signalen zu den Zentromer-Signalen festgestellt. Ab einer Anzahl von mehr als 10 FGFR1-Signalen, sowie einem Verhältnis von FGFR1 zu Zentromer 8 größer gleich 3 wurde eine hochgradige (high-level) Amplifikation angenommen. Bei einem Verhältnis größer gleich 2, aber kleiner als 3 lag eine niedriggradige (low-level) Amplifikation vor. Tumoren mit einem Verhältnis kleiner als 2 wurden als nicht amplifiziert betrachtet. Tumoren mit einer FGFR1-Amplifikation wurden außerdem in einer Großflächen-Analyse aller Tumor-enthaltenden Gewebeblocks des Patienten hinsichtlich der Verteilung (Heterogenität) der FGFR1-Amplifikation untersucht.

2.3 Ergebnisse

Die FISH Analyse war bei 510 von 600 (85%) Proben, davon 202 Plattenepithelkarzinome und 308 Adenokarzinome, erfolgreich. Eine insuffiziente Hybridisierung oder technische Aspekte der TMA-Technologie (z.B. fehlende Proben oder Fehlen von Karzinomzellen im Gewebespot) waren die Ursache für die 90 nicht auswertbaren Proben. Die Ergebnisse wurden in der Publikation ausführlich beschrieben, die wichtigsten Ergebnisse werden im folgenden zusammengefasst.

1. FGFR1 Amplifikationen waren signifikant häufiger in Plattenepithelkarzinomen (8,9%) als in Adenokarzinomen (1,6%) nachweisbar.
2. FGFR1 Amplifikationen waren weder mit dem Tumorphänotyp (Grad, Stadium) noch mit dem klinischen Verlauf assoziiert.
3. FGFR1 Amplifikationen waren in nahezu allen FGFR1 amplifizierten Tumoren homogen im gesamten Primärtumor und den verfügbaren Lymphknotenmetastasen vorhanden.
4. In 6 von 8 invasiven Karzinomen zeigte sich die FGFR1 Amplifikation bereits im angrenzenden dysplastischen Gewebe des Ösophagus.

2.4 Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen einen deutlichen Unterschied in der FGFR1 Amplifikationsrate zwischen den Plattenepithelkarzinomen und den Adenokarzinomen des Ösophagus.

Der FGFR1 Kopiezahlstatus der einzelnen Gewebespots wurde in unserer Studie mittels FISH bestimmt. Die FISH Analyse wird als die präziseste Methode zur Bestimmung der Genkopieanzahl angesehen. Grund dafür ist, dass die Analyse direkt im Gewebe erfolgt und damit die Anwesenheit von gesundem Gewebe bzw. normalen Zellen keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Die Ergebnisse unserer Studien stehen im Einklang mit den Ergebnissen zweier früherer FISH-Studien, welche Häufigkeiten von 8,6% und 11,5% FGFR1 Amplifikationen in 526 und 96 untersuchten ESCC fanden [16,17]. Im Vergleich dazu befindet sich unsere FGFR1-Amplifikationsrate im unteren Bereich von Studien, welche die weniger präzise Analyse-Technik der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) verwendeten und FGFR1 Amplifikationen in 6-21% von 32 und 70 untersuchten ESCC fanden [8,9].

In der „The Cancer Genom Atlas (TCGA)“ Studie konnte in 11 von 96 (11.5%) der untersuchten ESCC und nur in 4 der 88 untersuchten Adenokarzinome eine FGFR1-Amplifikation nachgewiesen werden (www.cbioportal.org; Stand Oktober 2016). Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls den Befund, dass es deutliche Unterschiede in der FGFR1 Amplifikationsrate zwischen den histologischen Untergruppen gibt. Darüber hinaus deuten die TCGA Daten daraufhin, dass FGFR1 Mutationen mit einer Rate von weniger als 1% ein seltenes Ereignis beim Ösophaguskarzinom darstellt. Daher ist annehmbar, dass die mutmaßliche onkogene Funktion des amplifizierten FGFR1 typischerweise durch das Wildtyp Gen vermittelt wird [17].

Der Vergleich des FGFR1 mRNA-Expressionsniveaus in einer kleinen Gruppe von FGFR1 amplifizierten und nicht amplifizierten Karzinomen ergab eine große Variationsbreite des mRNA-Expressionsniveau. Das insgesamt hohe FGFR1 Expressionsniveau in der Gruppe der FGFR1 amplifizierten Karzinome wurde hauptsächlich von nur zwei FGFR1 amplifizierten Karzinomen verursacht. Dies deutet darauf hin, dass Amplifikationen einen wichtigen Mechanismus darstellen, der zur FGFR1 Überexpression führt, aber hierzu möglicherweise nicht immer ausreicht.

In unserer Studie konnten wir eine deutlich höhere Rate der FGFR1 Amplifikationen beim ESCC (8,9%) im Vergleich zum EADC (1,6%) nachweisen. Die Ergebnisse unserer Studie stehen damit in Einklang mit den Ergebnissen einer vorherigen Studie in der ebenfalls eine leicht höhere FGFR1 Amplifikationsrate in 70 ESCC im Vergleich zu 189 EADC gefunden wurde [15]. Eine höhere Prävalenz der FGFR1 Amplifikationen beim Plattenepithelkarzinom im Vergleich zum Adenokarzinom konnte außerdem in Studien zum Lungenkarzinom gefunden werden [18,19]. Dies lässt die Annahme zu, dass die FGFR1 Aktivierung eine besondere Rolle bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen spielt. Des Weiteren könnte diese Veränderung mit spezifischen mutagenen Noxen, wie zum Beispiel dem Rauchen, assoziiert sein. Sowohl für das ESCC, als auch für das Plattenepithelkarzinom der Lunge gilt das Rauchen als einer der bekanntesten Risikofaktoren [20-22]. Unterschiede in der Häufigkeit von Gen-Amplifikationen zwischen dem ESCC und EADC konnten bereits für andere tumor-relevante Gene nachgewiesen werden. Dazu zählen zum Beispiel SOX2, PIK3CA, MYC, CCND1, welche eine höhere Amplifikationsrate in ESCC haben, sowie GATA4 und GATA6, welche eine höhere Rate in EADC aufweisen [15]. Dabei fällt auf, dass es sich bei diesen Genen häufig um Transkriptionsfaktoren handelt. Dies lässt die Annahme zu, dass die Amplifikation bzw. gesteigerte Expression dieser Gene zur spezifischen Deregulation bestimmter tumor-relevanter Gene führt und damit einen bestimmten molekularen Hintergrund liefert, der zur Entwicklung der beiden histologischen Typen beiträgt. Zum Beispiel sind Amplifikationen von GATA4 und GATA6 häufig in Adenokarzinomen unterschiedlichen Ursprungs zu finden.

Dass die FGFR1 Amplifikation ein frühes Ereignis bei der Entstehung von ESCC darstellt, wird unterstützt durch die Befunde an benachbarten Dysplasien. Es ist weiter anzunehmen, dass molekulare Veränderungen, welche vor oder während der malignen Transformation auftreten in allen daraus resultierenden Teilen des Karzinoms bzw. in allen Karzinomzellen zu finden sein müssen. Es zeigten sich FGFR1 Amplifikationen in 6 von 8 Plattenepithelzelldysplasien, welche an ein invasives amplifiziertes Karzinom angrenzen, sowie homogene Amplifikationen in 15 von 18 FGFR1 amplifizierten ESCC. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass die FGFR1 Amplifikation ein frühes Ereignis beim ESCC sein dürfte. Eine Rolle der FGFR1 Amplifikationen innerhalb der Tumorentstehung wird außerdem durch Studien an anderen Tumorentitäten unterstützt. Zum Beispiel sind FGFR1 Amplifikationen zu finden bei histologischen Vorstufen von Mammakarzinomen (Carcinoma-in-situ) [23,24] sowie in frühen Stadien des Lungenkarzinoms [18].

Interessanterweise wurde FGFR1 vor Kurzem als potentiell Ziel einer genspezifischen Therapie identifiziert. Eine Vielzahl von selektiven und nicht-selektiven kleinen molekularen Inhibitoren, welche FGFR1 und andere Tyrosinkinasen zum Ziel haben, werden derzeit in präklinischen und klinischen Versuchen untersucht. Dazu zählen zum Beispiel Dovitinib, Ki23057 und Ponatinib als nicht selektive Inhibitoren und die hochselektive Inhibitoren AZD4547 und BGJ398. Präklinische Studien haben die Wirksamkeit von AZD4547 und BGJ398 an FGFR1 Gen-amplifizierten Krebszellen jeweils in Zelllinien und Mäusemodellen demonstriert [25-29]. Die therapeutische Wirksamkeit von AZD4547 konnte außerdem in einer klinischen Phase II Studie (NCT01795768) als second-line Behandlung bei Patienten mit einer FGFR1 bzw. FGFR2 Amplifikation bei Tumoren der Mamma, der Plattenepithelkarzinome der Lunge, sowie gastroösophagealen Adenokarzinomen bereits nachgewiesen werden [30]. Eine weitere präklinische Studie deutet zudem darauf hin, dass diese Behandlung auch bei Ösophaguskarzinomen wirken könnte [31]. Dass in unserer Studie die FGFR1 Amplifikation in der Mehrzahl der Tumoren homogen vorlag und somit eine relevante Heterogenität ausgeschlossen werden kann, spricht für die putative Wirksamkeit und Anwendbarkeit einer anti-FGFR1 Therapie beim ESCC. Zukünftige klinische Studien sollten daher diese Therapie an FGFR1 amplifizierten ESCC testen.

Die FGFR1 Amplifikationen zeigten in unserer Studie in der Gruppe der 202 untersuchten ESCC keine Assoziation zu Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Metastasierung oder etwa dem klinischen Verlauf. Zwei Studien an 526 koreanischen und 79 japanischen Patienten mit ESCC wiesen eine Assoziation zwischen der FGFR1 Amplifikationen [16], immunhistologische Überexpression [32] und einer verkürzten Überlebensrate nach. Es ist möglich, dass ethnische Unterschiede zwischen kaukasischen und asiatischen Patienten zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Solche ethnischen Unterschiede wurden bereits bei anderen onkogenen Mechanismen, wie z.B. der HER2 Amplifikation beim Mammakarzinom [33], TMPRSS2-ERG Genfusion beim Prostatakarzinom [51], sowie MET Mutationen beim Lungenkarzinom [52] beschrieben.

Der FGFR1 Kopiezahlstatus wurde in unserer Studie pro Patient an einer 0,6 mm durchmessenden Gewebeprobe im TMA-Format bestimmt. Dass nur eine Probe pro Patient verwendet wurde, basiert auf den Ergebnissen von vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe, welche zeigen, dass die Verwendung von mehreren Gewebestanzungen (z.B. 3 pro Patient) die Validität der Ergebnisse bei der Untersuchung von molekularen Markern und deren Assoziation zum Tumorphänotyp oder klinischen Verlauf nicht verbessert. Im Gegensatz dazu hat die Verwendung von mehreren Proben den Nachteil eines höheren Gewebeverbrauchs und Arbeitsaufwandes, welcher nicht im Verhältnis zum Mehrwert der Studienergebnisse steht [34]. Die Verwendung von mehreren Gewebeproben pro Patient kann natürlich die Anzahl an analysierbaren Tumoren und somit die Anzahl der auswertbaren Patienten erhöhen. Allerdings kann es auch zu statistischen Verzerrungen kommen, wenn für die Patienten eine unterschiedliche Anzahl bewertbarer Proben besteht.

Tatsächlich gibt es eine Vielzahl von Studien, welche an TMAs aus je einer 0,6 mm durchmessenden Stanze pro Fall durchgeführt wurden und die prognostische Relevanz von nahezu allen vorherig anerkannten klinisch relevanten Biomarkern bestätigen. Dazu zählen zum Beispiel Alteration von Her2 [35] oder p53 [36], welche mit dem Gesamtüberleben bei Vorliegen eines Mammakarzinoms assoziiert sind, sowie mit Änderungen in der Vimentin Expression und deren Assoziation zur Prognose von Nierenkarzinomen [37]. Selbst zwischen typischerweise heterogen vorliegenden Markern, wie dem Ki67 labeling index und der Prognose von Karzinomen der Harnblase [38], der

Brust [39] und der Prostata [34] lässt sich dieser Zusammenhang durch die Analyse solcher TMAAs herstellen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass FGFR1 Amplifikationen ein frühes molekulares Ereignis bei der Entstehung bzw. Progression der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus darstellen. Auf Grund der ausgeprägten Homogenität und der Anzahl der hochgradig FGFR1 amplifizierten Tumoren kann die FGFR1 Amplifikation als vielversprechendes Ziel einer Gen-gerichteten Therapie bei ESCC angesehen werden.

2.5 Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom zählt zu den hoch aggressiven Tumorerkrankungen für die es nach der Diagnose häufig nur wenige Therapieoptionen gibt. Große Hoffnung wird daher in die Identifizierung bzw. Etablierung von sogenannten zielgerichteten Gentherapien gesetzt. Amplifikationen des „Fibroblast growth factor receptor 1“ (FGFR1) werden als putative prädiktive Marker für das Ansprechen auf eine zielgerichtet Anti-FGFR1 Therapie angenommen. Ziel der vorliegenden Studie war es daher die Prävalenz und die klinische Signifikanz der FGFR1 Amplifikation beim Ösophaguskarzinom zu klären. Dazu wurde der FGFR1-Gen-Kopiezahlstatus mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an 346 Plattenepithelkarzinomen und 254 Adenokarzinomen des Ösophagus im Gewebemikroarray (TMA)-Format untersucht. Die FGFR1 Amplifikation (Anzahl FGFR1-Signale im Verhältnis zu Zentromer 8-Signalen von 2 oder mehr) war signifikant häufiger beim Plattenepithelkarzinom (8,9% von 202 interpretierbaren Fällen) als im Adenokarzinom (1,6% von 308 interpretierbaren Fällen, $p < 0,0001$) vorhanden. Zum Tumorphänotyp (Differenzierungsgrad und Stadium) und klinischen Verlauf der Erkrankung konnte keine Assoziation der FGFR1 Amplifikation gefunden werden. Um den Status der Heterogenität der FGFR1 Amplifikation zu untersuchen, wurden Großflächenschnitte aller Tumorgewebeblöcke der 23 FGFR1 amplifizierten Tumoren analysiert. Diese Analyse ergab eine homogene Verteilung der FGFR1 Amplifikation in 20 (86,9%) der 23 Primärtumoren und in allen verfügbaren Lymphknotenmetastasen. Interessanterweise konnte die FGFR1 Amplifikation außerdem in 6 von 9 an den Primärtumor angrenzenden Dysplasien nachgewiesen werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die FGFR1 Amplifikation in einer relevanten Untergruppe des Ösophaguskarzinoms vorkommt und insbesondere eine Rolle bei der Entstehung des Plattenepithelkarzinoms spielen könnte. Die ausgeprägte Homogenität der FGFR1 Amplifikation lässt zudem die Annahme zu, dass Patienten mit einem FGFR1 amplifizierten Ösophaguskarzinom möglicherweise von einer Anti-FGFR1 Therapie profitieren könnten.

2.6 Abstract

Amplification of the *fibroblast growth factor receptor 1* (*FGFR1*) is believed to predict response to multi-kinase inhibitors targeting *FGFR1*. Esophageal cancer is an aggressive disease, for which novel targeted therapies are highly warranted.

This study was designed to investigate the prevalence and clinical significance of *FGFR1* amplification in a tissue microarray containing 346 adenocarcinomas and 254 squamous cell carcinomas of the esophagus, using dual-labeling fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis.

FGFR1 amplification, defined as a ratio of *FGFR1*:centromere 8 copy numbers ≥ 2.0 , was more frequently seen in squamous cell carcinoma (8.9% of 202 interpretable cases) than in adenocarcinoma (1.6% of 308; $p < 0.0001$). There was no association between *FGFR1* amplification and tumor phenotype or clinical outcome. To study potential heterogeneity of *FGFR1* amplification, all available tumor blocks from 23 *FGFR1* amplified tumors were analyzed on conventional large sections. This analysis revealed complete homogeneity of *FGFR1* amplification in 20 (86.9%) primary tumors and in all available lymph node metastases. Remarkably, *FGFR1* amplification was also seen in dysplasia adjacent to tumor in 6 of 9 patients with *FGFR1* amplified primary cancers.

In conclusion, *FGFR1* amplification occurs in a relevant subgroup of carcinomas of the esophagus and may play a particular role for development of squamous cell cancers. The high homogeneity of *FGFR1* amplification suggests that patients with *FGFR1* amplified esophageal cancers may particularly benefit from anti-*FGFR1* therapies and prompt for clinical studies in this tumor type.

2.7 Abkürzungsverzeichnis

CCND1	Gen (Eigenname)
CGH	comparative genomic hybridization
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
EADC	Adenokarzinom des Ösophagus (engl.: esophageal adenocarcinoma)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESCC	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (engl.: esophageal squamous cell carcinoma)
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: fibroblast growth factor receptor)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GATA4 und 6	Transkriptionsfaktoren (Eigennamen)
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit (engl.: gastroesophageal reflux disease)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
Ki67	Protein (Eigenname)
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MET	Protein (alias: hepatocyte growth factor receptor (HGFR))
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid)
MYC	Gen und gleichnamiges Protein
n	Anzahl (Formelzeichen)
p-Wert	Signifikanzwert
PIK3CA	katalytische Untereinheit der Phosphoinositid-3 Kinase
PI3K/AKT	Phosphatidylinositid-3-Kinase/Protein kinase B (PKB)
p53	Tumorsuppressorgen (Eigenname)
SOX2	Transkriptionsfaktor (Eigenname)
TCGA	The Cancer Genom Atlas
TMA	Gewebemikroarray, (engl.: Tissue Mikroarray)
TMPRSS2-ERG	Fusionsgen (Transmembrane protease, serine 2; ETS-related gene)
TNM	Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasen)
UICC	Union for International Cancer Control
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization)

2.8 Literaturverzeichnis

1. Herold, Gerd und Mitarbeiter (2011): Innere Medizin 2012. Auflage 2012, Köln
2. Robert Koch Institut (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c15_speiseroehre.pdf;jsessionid=
3. Global Cancer Statistic, 2012 Lindsey A. Torre MSPH1,*, Freddie Bray PhD2, Rebecca L. Siegel MPH3, Jacques Ferlay ME4, Joannie Lortet-Tieulent MSc5 andAhmedin Jemal DVM, PhD6
4. T. Glatz, G. Marjanovic, K. Zirlik, T. Brunner, U.T. Hopt, F. Makowiec, J. Hoepfner. Chirurgische Therapie des Ösophaguskarzinoms - Entwicklung von Management und Prognose über die letzten drei Jahrzehnte. Chirurg 2015, 86:662–669
5. Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, et al. (1997) Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. Cancer Res 57: 4360–4367. pmid:9331099
6. Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, Lambros MB, Jones C, et al. (2006) FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. Clin Cancer Res 12: 6652–6662. pmid:17121884 doi: 10.1158/1078-0432.ccr-06-1164
7. Brunello E, Brunelli M, Bogina G, Calio A, Manfrin E, et al. (2012) FGFR-1 amplification in metastatic lymph-nodal and haematogenous lobular breast carcinoma. J Exp Clin Cancer Res 31: 103. doi: 10.1186/1756-9966-31-103. pmid:23270564
8. Jiang T, Gao G, Fan G, Li M, Zhou C (2015) FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: a systematic review with meta-analysis. Lung Cancer 87: 1–7. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.11.009. pmid: 25433983
9. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, et al. (2010) Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. Sci Transl Med 2: 62ra93. doi: 10.1126/scitranslmed.3001451. pmid:21160078
10. Heist RS, Mino-Kenudson M, Sequist LV, Tammireddy S, Morrissey L, et al. (2012) FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung. J Thorac Oncol 7: 1775–1780. pmid:23154548 doi: 10.1097/jto.0b013e31826aed28
11. Schildhaus HU, Heukamp LC, Merkelbach-Bruse S, Riesner K, Schmitz K, et al. (2012) Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. Mod Pathol 25: 1473–1480. doi: 10.1038/modpathol.2012.102. pmid:22684217
12. Freier K, Schwaenen C, Sticht C, Flechtenmacher C, Muhling J, et al. (2007) Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Oral Oncol 43: 60–66. pmid:16807070 doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.01.005
13. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, et al. (2012) Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. Nat Genet 44: 1104–1110. doi: 10.1038/ng.2396. pmid:22941188
14. Ishizuka T, Tanabe C, Sakamoto H, Aoyagi K, Maekawa M, et al. (2002) Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. Biochem Biophys Res Commun 296: 152–155. pmid:12147242 doi: 10.1016/s0006-291x(02)00836-7
15. Bandla S, Pennathur A, Luketich JD, Beer DG, Lin L, et al. (2012) Comparative genomics of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Ann Thorac Surg 93: 1101–1106. doi: 10.1016/j.athoracsur.2012.01.064. pmid:22450065
16. Kim HS, Lee SE, Bae YS, Kim DJ, Lee CG, et al. (2015) Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival in patients with resected esophageal squamous cell carcinoma. Oncotarget 6: 2562–2572. pmid:25537505 doi: 10.18632/oncotarget.2944
17. The Cancer Genom Atlas (2015): <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>

18. Cihoric N, Savic S, Schneider S, Ackermann I, Bichsel-Naef M, et al. (2014) Prognostic role of FGFR1 amplification in early-stage non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 110: 2914–2922. doi: 10.1038/bjc.2014.229. pmid:24853178
19. Preusser M, Berghoff AS, Berger W, Ilhan-Mutlu A, Dinhof C, et al. (2014) High rate of FGFR1 amplifications in brain metastases of squamous and non-squamous lung cancer. *Lung Cancer* 83: 83–89. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.004. pmid: 24183471
20. Lubin JH, Cook MB, Pandeya N, Vaughan TL, Abnet CC, et al. (2012) The importance of exposure rate on odds ratios by cigarette smoking and alcohol consumption for esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Cancer Epidemiol* 36: 306–316. doi: 10.1016/j.canep.2012.03.001. pmid:22504051
21. Seo AN, Jin Y, Lee HJ, Sun PL, Kim H, et al. (2014) FGFR1 amplification is associated with poor prognosis and smoking in non-small-cell lung cancer. *Virchows Arch* 465: 547–558. doi: 10.1007/s00428-014-1634-2. pmid:25086725
22. Kim HR, Kim DJ, Kang DR, Lee JG, Lim SM, et al. (2013) Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31: 731–737. doi: 10.1200/JCO.2012.43.8622. pmid:23182986
23. Brady N, Chuntova P, Bade LK, Schwertfeger KL (2013) The FGF/FGFR axis as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 8: 391–402. pmid:25400686 doi: 10.1586/17446651.2013.811910
24. Welm BE, Freeman KW, Chen M, Contreras A, Spencer DM, et al. (2002) Inducible dimerization of FGFR1: development of a mouse model to analyze progressive transformation of the mammary gland. *J Cell Biol* 157: 703–714. pmid: 12011115 doi: 10.1083/jcb.200107119
25. Goke F, Franzen A, Hinz TK, Marek LA, Yoon P, et al. (2015) FGFR1 expression levels predict BGJ398-sensitivity of FGFR1-dependent head and neck squamous cell cancers. *Clin Cancer Res*. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-14-3357
26. Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, Thomas AP, Al-Kadhimi K, et al. (2012) AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res* 72: 2045–2056. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3034. pmid:22369928
27. Zhang J, Zhang L, Su X, Li M, Xie L, et al. (2012) Translating the therapeutic potential of AZD4547 in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer through the use of patient-derived tumor xenograft models. *Clin Cancer Res* 18: 6658–6667. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2694. pmid:23082000
28. Guagnano V, Kauffmann A, Wohrle S, Stamm C, Ito M, et al. (2012) FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2: 1118–1133. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0210. pmid:23002168
29. Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, et al. (2011) Discovery of 3-(2, 6-dichloro-3, 5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamin o]-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: 7066–7083. doi: 10.1021/jm2006222. pmid:21936542
30. U.S. National Institutes of Health (2013): [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01795768). Proof-of-Concept Study of AZD4547 in Patients With FGFR1 or FGFR2 Amplified Tumours (FGFR). NCT01795768
31. Saito S, Morishima K, Ui T, Hoshino H, Matsubara D, et al. (2015) The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibroblast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 15: 82. doi: 10.1186/s12885-015-1065-8. pmid:25884729
32. Sugiura K, Ozawa S, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M (2007) Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 17: 557–564. pmid:17273733 doi: 10.3892/or.17.3.557
33. Al-Kuraya K, Schraml P, Sheikh S, Amr S, Torhorst J, et al. (2005) Predominance of high-grade pathway in breast cancer development of Middle East women. *Mod Pathol* 18: 891–897. pmid:15803183 doi: 10.1038/modpathol.3800408

34. Tennstedt P, Köster P, Brüchmann A, Mirlacher M, Haese A, Steuber T, Sauter G, Huland H, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Simon R (2011) The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol*. 2012 Jan;40(1):261-8. doi: 10.3892/ijo.2011.1216. Epub 2011 Sep 28.
35. Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, et al. (2000) Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 92: 1252–1259. pmid:10922410 doi: 10.1093/jnci/92.15.1252
36. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, et al. (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249–2256. pmid:11733374 doi: 10.1016/s0002-9440(10)63075-1
37. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, et al. (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154: 981–986. pmid:10233835 doi: 10.1016/s0002-9440(10)65349-7
38. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, et al. (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194: 349–357. pmid: 11439368 doi: 10.1002/1096-9896(200107)194:3<349::aid-path887>3.0.co;2-d
39. Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, et al. (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118: 2190–2194. pmid:16331604 doi: 10.1002/ijc.21581

3. Eigenanteil an der Publikation

Eigenanteil

1. Mitarbeit bei der Herstellung der TMAs, Auswahl der Tumoren für den TMA, Konstruktion des TMA-Aufbaus
2. Review der Tumoren unter Anleitung
3. FISH-Analyse und statistische Datenanalyse
4. Literaturrecherche zu FGFR1 beim Ösophaguskarzinom und in Tumoren allgemein
5. Schreiben der ersten Version des Manuskriptes, inklusive Erstellen aller Tabellen und Abbildungen

Anteil der Ko-Autoren

1. Pathologische Beurteilung der Tumoren: Katharina von Loga, Frank Jacobsen und Stefan Steurer
2. FISH-Analyse: Katharina von Loga
3. Datenakquisition, Datenbankgenerierung und statistische Analyse: Lia Burkhardt und Susanne Burdak-Rothkamm
4. Mitarbeit an der Verfassung des Manuskriptes: Ronald Simon, Katharina von Loga und Till Krech
5. Studiendesign und Studienkoordination: Guido Sauter, Ronald Simon, Till Krech und Katharina von Loga

4. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Guido Sauter, dass er mir die Möglichkeit gab mit ihm und seinem Team zu arbeiten. Durch die Betreuung und Unterstützung konnte ich das wissenschaftliche Arbeiten ergründen.

Zudem danke ich Katharina von Loga, in enger Zusammenarbeit mit ihr ist diese Publikation entstanden. Sie war eine gute Lehrerin und hatte immer Zeit für mich.

Ich danke Ronald Simon, Christina Koop, Martina Kluth, Alexander Quaas, sowie den weiteren Mitarbeitern für ihren Beitrag an der Arbeit. Danke an Thorsten und Ali, welche für die mechanische Fertigstellung der TMAs verantwortlich waren, sie leisteten mir während manch langer Stunden im Institut sehr gute Gesellschaft.

Ebenso möchte ich Corinna Kröger danken, sie hat dafür gesorgt, dass ich nie aufgegeben habe und ohne sie, wäre ich heute nicht da, wo ich bin.

Großen Dank auch an meine Eltern, welche mir dieses Studium überhaupt ermöglichten und immer hinter mir stehen!

5. Lebenslauf

Name:	Jule Kröger
Geburtsname:	Kohlhaussen
Geburtsort:	Marburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Berufserfahrung

01/14 - heute	Weiterbildung Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Helios Mariahilf Krankenhaus Hamburg)
---------------	--

Publikation

2015	Institute of Pathology, Hamburg, Germany. PLoS One. 11/2015; Source: PubMed
------	--

Studium

10/07 - 11/13	Universität Hamburg, Studium der Humanmedizin Staatsexamen November 2013
---------------	---

Schulische Ausbildung

1998 - 2007	Clemens-Brentano-Europa-Schule Lollar in Hessen Abschluss: Abitur
1994 - 1998	Grundschule Salzböden in Hessen

6. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

