

**Uniwersytet Medyczny w Łodzi**  
**Wydział Lekarski**

***Znaczenie kliniczne osi FGFR2-PR w inwazyjnym raku piersi***

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

**Marcin Braun**

**lekarz**

Promotor: dr hab. n. med. Hanna Maria Romańska-Knight, prof. UM w Łodzi

Pracę wykonano  
w Zakładzie Patologii, Katedry Onkologii,  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Radzisław Kordek  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Radzisław Kordek

Praca finansowana z projektu badawczego:  
grant OPUS 9 Narodowego Centrum Nauki nr 2015/17/B/NZ4/02157

**Łódź 202**

## STRESZCZENIE

---

---

### **Wstęp:**

Niezależny od hormonów steroidowych wzrost guza i wykształcenie oporności na terapię hormonalną są jednymi z głównych przyczyn progresji nowotworu i niepowodzeń terapeutycznych wśród pacjentek z inwazyjnym luminalnym rakiem piersi. Badania przedkliniczne pokazały, że interakcja pomiędzy sygnalizacjami od receptora czynnika wzrostu dla fibroblastów 2 (ang. fibroblast growth factor receptor 2; FGFR2) i od receptorów hormonów steroidowych (ang. estrogen and progesterone receptors; ER i PR) może warunkować oporność na hormonoterapię. Czynnikiem odpowiedzialnym za to jest m.in. hiperaktywacja PR i jego wzmożony obrót wewnątrzkomórkowy (ang. turnover),

co odzwierciedlone jest przez specyficzny profil transkrypcyjny PR (aktywność niezależna od liganda) i prowadzi do pozornego zaniku obecności jego formy białkowej. Wspomniane badania przedkliniczne na temat znaczenia osi FGFR2-PR nie znalazły jeszcze odzwierciedlenia w materiale klinicznym.

### **Cel pracy:**

Określenie znaczenia prognostycznego ekspresji białka i mRNA genu *FGFR2* w guzach pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi w kontekście standardowo ocenianych czynników prognostycznych i predykcyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem statusu receptorów steroidowych i sygnatury molekularnej związanej z hiperaktywacją PR. Celem drugoplanowym była ocena przydatności sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego (ang. artificial intelligence, AI), jako metody o potencjale zrewolucjonizowania patomorfologii, na przykładzie oceny immunohistochemicznego oznaczenia białka FGFR2 przy pomocy AI.

### **Materiały i metody:**

Po podsumowaniu dotychczasowych badań nad interakcją FGFR2-PR-ER w raku piersi (pierwsza praca z cyklu publikacji), w materiale od 353 pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi bez specjalnego podtypu (ang. invasive breast carcinoma of no special type wg klasyfikacji WHO 2019; IBC NST), po ocenie histopatologicznej, wykonana została dyssekcja reprezentatywnych obszarów guza. W pobranych skrawkach oznaczono immunohistochemicznie poziom białka FGFR2. Preparaty zostały zdigitalizowane

za pomocą Panoramic 1000 Scanner (3DHitech, Sysmex) i ocenione przez autora pracy, jak i przez własnoręcznie opracowany algorytm automatycznej oceny przy pomocy oprogramowania CaseViewer/ QuantCenter (3DHitech, Sysmex). Obydwa sposoby analizy barwienia porównano w kierunku zgodności między obserwatorami w celu oceny przydatności AI w standardowej ocenie preparatów histopatologicznych (trzecia praca z cyklu publikacji). Równolegle, po izolacji całkowitego RNA ze zdyssekowanych skrawków, zmierzono poziom mRNA genu *FGFR2* i 20 genów obrazujących profil transkrypcyjny związany z aktywnością niezależną od liganda (oznaczony dalej jako PR(mol)), wybranych na podstawie bioinformatycznej analizy ogólnodostępnych danych z projektu The Cancer Genome Atlas (TCGA). Poziom mRNA został zmierzony za pomocą metody Plexset Nanostring dedykowanej do pomiarów RNA wyizolowanego z materiału utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie. Za pomocą analizy klasteryzacyjnej (metodą k-średnich i metodą drzewa hierarchicznego) danych ekspresyjnych stworzono sygnaturę PR(mol). Następnie, w kontekście statusu białkowego receptorów steroidowych i PR(mol), oceniono statystycznie związki między poziomem białka i mRNA genu *FGFR2* a standardowo stosowanymi czynnikami rokowniczymi oraz przeżyciem całkowitym (ang. overall survival; OS) i przeżyciem wolnym od choroby (ang. disease-free survival; DFS). Uzyskane wyniki zweryfikowano w analizie biostatystycznej ogólnodostępnych danych ekspresyjnych (na poziomie mRNA) z TCGA i eksperymentów mikromacierzowych bazy KMplotter™ (druga z cyklu publikacji).

### **Wyniki:**

Do badania zakwalifikowano 353 pacjentki z guzami: ER+PR+ (246/69,7%), ER+PR- (73/20,7% i ER-PR- (34/9,6% - grupa kontrolna). Oznaczenie białka FGFR2 wykonano u wszystkich pacjentek a oznaczenie poziomu mRNA u 346 pacjentek (98,0% - u 7 pacjentek jakoś RNA uniemożliwiła analizę). Zgodność oceny poziomu białka FGFR2 za pomocą AI i wykonana przez patologa (autora pracy doktorskiej) była wysoka (współczynnik Kappa Cohena = 0,61), jednakże stwierdzono rozbieżności w ocenie skrajnych przypadków (całkowicie ujemnych i silnie dodatnich) a ocena automatyczna zajęła 568 godzin wobec 32 godzin poświęconych przez patologa. Poziom ekspresji białka FGFR2 był wyższy u pacjentek ER+PR+ i ER+PR- w porównaniu do pacjentek ER-PR- ( $p < 0,001$ ). Niski poziom FGFR2 był istotnie związany ze złymi czynnikami prognostycznymi, takimi jak wysoki stopień złośliwości histopatologicznej ( $p < 0,001$ ), czy wysoki indeks proliferacyjny Ki67 ( $p < 0,001$ ), jak i miał bezpośredni związek ze złym

rokowaniem u chorych, zarówno z czasem przeżycia całkowitego (HR = 2,34 (95% PU: 1,26–4,34), p = 0,007), jak i czasem wolnym od choroby (HR = 2,22 (95% PU: 1,25–3,93, p = 0,006). Zły efekt prognostyczny niskiego poziomu FGFR2 był obecny u pacjentek ER+PR+ a nie stwierdzono go w grupie ER+PR-. Powyższe obserwacje, na poziomie mRNA, potwierdzono w analizie danych z baz zewnętrznych, TCGA (n=1242 pacjentki) i KMplotter™ (n=3951 pacjentek). Spośród 20 genów-kandydatów (*ACOT6, BIRC3, CEPBD, EP400, F3, FKBP5, GAS6, HSD11B2, KLF4, NEDD4, NET1, RASGRP4, RASSF2, RGS2, S100, SIAH2, SLC39A14, STAT5A, UCK2*) do sygnatury PR(mol) wyłoniono cztery: *SIAH2, PGR, BIRC3, UCK2*, dyskryminujące w najlepszy sposób pacjentki ER+PR+ od pacjentek ER-PR- i ER+PR-. Następnie wszystkie pacjentki sklasyfikowano jako PR(mol+) (204/59,1%) i PR(mol-) (142/40,9%). W porównaniu do pacjentek PR(mol+), pacjentki PR(mol-) cechowały się złymi cechami prognostycznymi, takimi jak wyższy stopień złośliwości histologicznej guza (p = 0,039), wyższy indeks proliferacyjny Ki67 (p = 0,003), częstsza amplifikacja HER2 (p = 0,002), i większy rozmiar guza (p = 0,007). W analizie wieloczynnikowej, zły efekt prognostyczny niskiego poziomu FGFR2 był niezależny od statusu PR(mol).

#### **Wnioski:**

Wyniki badań nie potwierdziły hipotezy opartej na badaniach przedklinicznych sugerujących związek pomiędzy podwyższonym poziomem ekspresji FGFR2 i złym rokowaniem u pacjentek z inwazyjnym luminalnym rakiem piersi. Przedstawione w pracy badania wykazały efekt odwrotny – związek niskich poziomów białka FGFR2 ze słabym zróżnicowaniem i większą agresywnością guzów oraz z gorszym rokowaniem w tej grupie pacjentek. Opisane efekty obecne były jedynie wśród pacjentek ER+PR+ i wszystkie te obserwacje zostały potwierdzone na poziomie mRNA w niezależnych zewnętrznych bazach danych. Uzyskane wyniki świadczą o złożoności roli FGFR2 w patogenezie inwazyjnego raka piersi i zależności znaczenia prognostycznego FGFR2 od kontekstu biologicznego. Znaleźiska pracy doktorskiej mogą tłumaczyć uzyskane dotychczas wątpliwe efekty terapeutyczne celowanego hamowania szlaku FGFR w badaniach klinicznych. Zanik złego efektu niskiego poziomu FGFR2 w grupie pacjentek ER+PR- pokazuje jednocześnie, że istnieje grupa pacjentek, które potencjalnie mogą odnieść korzyść terapeutyczną w wyniku hamowania FGFR2-zależnej sygnalizacji. Praca doktorska pokazała również, że pomimo niewątpliwej użyteczności, w pewnej grupie przypadków wykorzystanie AI w patologii jako narzędzia jest uzależnione od nadzoru specjalisty-patologa.

## SUMMARY

---

---

### **Introduction:**

Hormone-independent tumour growth and resistance to endocrine therapy are recognized as the major causes of cancer progression and cancer-related deaths among patients with luminal type breast cancer (BCa). Preclinical studies have shown that the crosstalk between fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)- and estrogen/ progesterone receptors (ER/ PR)-mediated pathways may result in resistance to antihormonal agents. The molecular mechanisms underlying this phenomenon involve ligand-independent, FGFR2-mediated induction of transcriptional hyperactivation of PR, characterized by its rapid turn-over and proteasomal degradation, which makes it undetectable (negative) on the protein level. However, preclinical findings implicating the role of the FGFR2-PR axis in luminal BCa have not been verified in the material from patients.

### **Aims of the study:**

To assess the prognostic value of mRNA and protein FGFR2 expression in breast cancer patients in the context of routinely evaluated prognostic and predictive features with a special reference to hormonal receptor status and molecular signature of the 'hyperactive' PR. In addition, the study aimed to value the utility of artificial intelligence (AI) and machine learning (ML) as a revolutionary novel technology in diagnostic pathology by application of AI/ML for immunohistochemical assessment of FGFR2 in breast cancer.

### **Materials and methods:**

Following a comprehensive literature review related to the FGFR2-PR-ER crosstalk (summarized in the first article of the presented publication cycle), representative tumoral tissue from 353 patients with invasive breast carcinoma of no special type (IBC NST, WHO 2019) was dissected. Immunohistochemistry was applied for FGFR2 protein detection. The prepared slides were digitalized using Panoramic 1000 Scanner (3DHitech, Sysmex) and FGFR2 levels were evaluated by the Author and concurrently by an originally developed automated algorithm using CaseViewer/ QuantCenter software (3DHitech, Sysmex). Interrater reliability between AI/ML and pathologist was compared to assess the utility of AI/ML in routine histopathological examination (the third article of the presented publication cycle). To account for transcriptionally 'hyperactive' but rapidly degraded PR-cases (negative on the protein level), a molecular

signature reflecting activation of PR-dependent genes was designed. Firstly, 20 genes-candidates were selected based on the bioinformatic analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) and detailed literature review. Then mRNA of the selected genes, *PGR* and *FGFR2* was quantified using Plexset Nanostring method dedicated for RNA quantification in the material isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE). Using k-mean and tree hierarchical clustering of expression data, the final signature of PR molecular activity (PR(mol)) was developed. In the next step, the prognostic significance of *FGFR2* expression (on both mRNA and protein levels) was evaluated in relation to the ER/PR status and PR(mol) signature in the context of routinely evaluated clinicopathological BCa features, and patient overall (OS) and disease-free survival (DFS). Finally, the results were verified using data accessed from external open-access databases - TCGA and KMplotter™ (the second article of the presented publication cycle).

### **Results:**

Three-hundred fifty-three BCa patients were recruited (ER+PR+ (246/69.7%), ER+PR- (73/20.7%) and ER-PR- (34/9.6%) – control group). FGFR2 protein was evaluated in all patients and mRNA quantification was effective in 346 patients (98.0% - in 7 cases the quality of material was poor). The interrater reliability between AI/ML and pathologist assessment was substantial (Cohen's kappa=0.61), but significant discrepancies were detected in cases of extreme (strongest/weakest) or heterogeneous FGFR2 expression and poor tissue quality. The time of AI was significantly longer (568 hours) than that of the pathologist's (32 hours). FGFR2 level was higher in ER+PR+ and ER+PR- cases when compared to ER-PR- ( $p < 0.001$ ). Low FGFR2 was associated with higher grade ( $p < 0.001$ ), higher Ki67 proliferation index ( $p < 0.001$ ), and worse overall and disease-free survival (HR = 2.34 (95% CI: 1.26–4.34),  $p = 0.007$  and HR = 2.22 (95% CI: 1.25–3.93),  $p = 0.006$ , respectively). The poor prognostic value of low FGFR2 was apparent in ER+PR+, but not in ER+PR- patients. These results were confirmed on mRNA level in external open-access databases TCGA (n=1242 patients) and KMplotter (n=3951 patients). Out of 20 genes-candidates (*ACOT6*, *BIRC3*, *CEPBD*, *EP400*, *F3*, *FKBP5*, *GAS6*, *HSD11B2*, *KLF4*, *NEDD4*, *NET1*, *RASGRP4*, *RASSF2*, *RGS2*, *S100*, *SIAH2*, *SLC39A14*, *STAT5A*, *UCK2*), four were included in the final PR(mol) signature: *SIAH2*, *PGR*, *BIRC3*, *UCK2* (best discriminating ER+PR+ from ER-PR- and ER+PR- patients). Two-hundred four patients (59.1%) were classified as PR(mol+) and 142 (40.9%) as PR(mol-). PR(mol-) tumors were characterized by higher grade ( $p = 0.039$ ) and Ki67

index ( $p = 0.003$ ), more frequent HER2 amplification ( $p = 0.002$ ), and larger size ( $p = 0.007$ ), when compared to PR(mol+) patients. In the multivariate analysis, poor prognostic effect of FGFR2<sub>low</sub> was independent of the PR(mol) status.

**Conclusions:**

The presented results were contradictory to the implicated by preclinical studies association between increased activity of FGFR2 and poor prognosis of patients with luminal BCa. The data showed that low expression of FGFR2 was associated with poor differentiation and aggressiveness of tumours, as well as poor prognosis in this subgroup of patients. The described relationships were apparent only in ER+PR+ patients and the observations were confirmed on the mRNA level in external databases. These findings indicate a multifactorial role of FGFR2 in BCa pathogenesis and highlight the dependence of its prognostic significance on a biological landscape of the tumour. The findings of the presented doctoral thesis may provide, at least partially, an explanation for unsatisfactory results of clinical trials of FGFR inhibitors in BCa. Loss of relevance of low FGFR2 as an indicator of poor prognosis in ER+PR- patients indicates that a subpopulation of BCa patients might benefit from the FGFR-targeted therapy. The data included in the thesis also showed that machine learning/artificial intelligence can reliably execute mundane pathological tasks, however, in some instances, human expertise is essential.