

T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİMDALI

**HER2 POZİTİF METASTATİK MEME
KANSERİNDE PTEN, p27 VE PI3K
EKSPRESYONUNUN PREDİKTİF VE
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

Dr. Sadi Kerem Okutur
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Gökhan Demir

İSTANBUL 2011

TEŞEKKÜR

Yandal asistanlığım süresince en büyük destek ve yakınlığı gördüğüm, sadece bilgisinden ve deneyimlerinden değil insanlığından da çok şey öğrendiğim değerli hocam Prof. Dr. Osman Gökhan Demir başta olmak üzere, eğitimime büyük katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Coşkun Tecimer' e, Doç. Dr. Zafer Akçalı' ya, Prof. Dr. Reyhan Diz Küçükkaya' ya, Prof. Dr. Yüksel Altuntaş' a, Prof. Dr. Levent Erdem' e, Prof. Dr. Mutlu Arat' a, Prof. Dr. Süheyla Apaydın' a, Doç. Dr. Şefik İğdem' e, Prof. Dr. Gülen Bülbül Doğusoy' a, Rektörümüz Prof. Dr. Hakan Berkkan' a ve Dekanımız Prof. Dr. Çavlan Çiftçi' ye teşekkür ederim.

Tezimin yapım aşamasında büyük yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Nuray Başsülü' ye ve sevgili arkadaşım Gülcan Turan' a teşekkür ederim.

Her zaman saygı ve sevgiyle çalıştığım arkadaşlarım Dr. Kübra Aydın, Dr. Mustafa Bozkurt, Dr. Esat Namal, Dr. Akın Öztürk ve İç Hastalıkları Anabilimdalı asistan doktorlarına teşekkür ederim.

Başta günlük hayatın yoğunluğunu ve yorgunluğunu paylaştığım değerli arkadaşım Tijen Hatırnaz olmak üzere Onkoloji Bilimdalı' nın tüm hemşirelerine ve personeline teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde hiçbir fedakarlığı esirgemeyen sevgili anneme ve babama, desteğiyle her zaman yanımda olan kardeşim Gözde' ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GENEL BİLGİLER.....	4
Meme kanserinin epidemiyolojisi.....	5
Meme kanserinin etyolojisi.....	5
Meme kanserinin biyolojisi.....	5
Meme kanseri genomu.....	12
Meme kanserinin moleküler profili.....	13
HER2 biyolojisi.....	16
HER2 durumunun değerlendirilmesi.....	18
PI3K/Akt sinyal yolu.....	22
Trastuzumab.....	22
Etki mekanizmaları.....	25
Klinikte kullanımı.....	33
Trastuzumab direnci.....	41
GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
BULGULAR.....	59
TARTIŞMA.....	76
ÖZET.....	85
İNGİLİZCE ÖZET.....	87
KAYNAKLAR.....	90

GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Meme kanseri kadınlarda tüm dünyada en sık görülen kanser tipidir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sırayı almaktadır. 2002 yılında tüm dünyadaki tahmini olgu sayısının 1.5 milyon civarında olduğu belirtilmiştir. Olguların yarısından fazlası endüstrileşmiş ülkelerdendir (Avrupa’ da yaklaşık 361.000, Kuzey Amerika’ da 230.000). Yeni açıklanan verilere göre 2008’ de tüm dünyada tahmin edilen yeni vaka sayısı 1.383.500, meme kanserine bağlı ölüm sayısı ise 458.400 olarak tahmin edilmektedir (1). Toplam insidans oranlarının yılda ~%0.5 artacağı öngörüldüğünde 2010 yılında 1.4 milyon yeni meme kanseri olgusu beklenmektedir (1). Türkiyede ise sağlık bakanlığının 2006 yılı verilerine göre meme kanseri sıklığı 37/100000 olarak bildirilmiştir ve her yıl 30000 yeni vaka olacağı tahmin edilmektedir (2).

Meme kanseri sıklığının mamografinin tarama yöntemi olarak kullanımının giderek artması ile paralel olarak 1990’ lardan itibaren sabit bir şekilde artış göstermesinden sonra, 2002’ den itibaren bir düşüş trendi gözlenmektedir. Bu düşüşün, hormon replasman tedavisi olarak (HRT) kullanılan östrojen+progestin (Ö+P) kombinasyonunun getirdiği risklerin sağladığı yararlarla ağır bastığını bildiren WHI (Women Health Initiative) çalışmasının sonuçlarının 2002’ de yayınlanmasından sonra görülen HRT kullanımındaki dramatik azalmadan kaynaklandığı düşünülmüştür (3). Yapılan analizlerde meme kanseri sıklığındaki azalmanın öncelikle HRT tedavisinin en sık kullanıldığı yaş grubu olan 50 yaş üstü kadınlarda görülmesi ve özellikle ER pozitif tümörlerin görülme sıklığındaki azalmanın ER negatif tümörlere göre daha belirgin olması HRT’ nin kullanımındaki azalma ile meme kanseri riskindeki düşüş arasındaki ilişkiyi desteklemiştir (4). Buna karşın HRT’ nin kesilmesinin tümörün klinik olarak saptanmasını geciktirerek kısa vadede meme kanseri sıklığında azalmaya yol açması da

mümkündür. WHI çalışmasının son yayınlanan güncellenmiş uzun izlem sonuçlarında Ö+P tedavisi alan postmenapozal kadınlarda plaseboyla kıyaslandığında meme kanseri sıklığında anlamlı artış saptanmıştır (5). Meme kanserine bağlı mortalite ise giderek azalmaktadır. Bu durum, erken tanı olanaklarının daha sık kullanıma girmesi, HRT kullanımındaki azalma ve yeni tedavi seçeneklerinin artması ile açıklanmaktadır (6).

İnsidans ve mortalite açısından meme kanserinin dünyadaki dağılımında büyük farklılıklar bulunmaktadır. En yüksek meme kanseri insidansı Kuzey Amerika’ da bulunmaktadır (99.4/100.000). Buna karşın en düşük mortalite oranı yine Kuzey Amerika’ ya aittir (yaklaşık %25). Çin ve Afrika’ da meme kanseri insidansı çok düşük olmasına karşın (sırasıyla 11.7 ve 13.64/100.000) mortalite oranları yüksek seyretmektedir (yaklaşık %45). Meme kanserine bağlı mortalite az gelişmiş ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek görünmektedir. İnsidans ve mortalitedeki bu farklılıkların altta yatan yaş, diyet, etnisite ve yaşam şekli gibi kompleks faktörlerdeki farklılıkların yansımaları olduğu düşünülmektedir (6).

MEME KANSERİNİN ETYOLOJİSİ (7)

Olguların büyük çoğunluğunda etyoloji bilinmemekle birlikte tablo 1’ de görülen çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır.

MEME KANSERİNİN BİYOLOJİSİ

Meme kanserinin genetik bir hastalık olduğunun belirlenmesi ve altta yatan moleküler lezyonların daha iyi anlaşılması, hastalığa yönelik tanı yöntemleri, önleme stratejileri ve tedavi olanaklarının artmasını sağlamıştır. Diğer epitelyal kanserlerde de olduğu gibi geleneksel antimitotik kemoterapi meme kanserinin ampirik tedavisinde kullanılmıştır. Meme kanserine spesifik terapötik hedefler olan östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (ErbB2 veya HER2/neu) keşfi ise bu hedefleri taşıyan meme kanserli hastaların tedavisindeki en önemli gelişme olmuştur (7).

Tablo 1- Meme kanserinde risk faktörleri

Cinsiyet	Kadın-erkek oranı yaklaşık 100:1' dir.
Yaş	Meme kanseri görülme riski yaşla artmaktadır. 40 yaş altında hastalık nadiren görülürken, 65 yaşına kadar risk 6 kat kadar artmaktadır.
Diet	Alkol alımı en iyi bilinen dietsel risk faktörü iken, folat alımı meme kanseri riskini azaltmaktadır.
Obezite	Vücut kitle indeksi ile meme kanseri riski arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Bu ilişkinin artmış endojen östrojen düzeyinden kaynaklandığı düşünülmektedir.
Hormonal faktörler	Postmenapozal dönemde hormon replasman tedavisinin riski arttırdığı düşünülmektedir.
Reproduktif faktörler	Erken menarş, geç menapoz, nulliparite, geç yaşta doğum yapmış olmak riski artırırken, emzirme riski azaltmaktadır.
İyonize radyasyon	Düşük dozda dahi karsinojenik bulunmuştur ve risk doz ile doğru orantılı olarak artmaktadır.
Aile öyküsü	Birinci derece akrabalarının birinde meme kanseri bulunanlarda risk 2 kat artmaktadır.
Daha önceye ait meme kanseri öyküsü	İkincil meme kanseri gelişme riskinin her yıl %1 arttığı düşünülmektedir.
Proliferatif meme hastalığı öyküsü	Orta derecede duktal hiperplazi ve sklerozan adenozis riski 1.5-2 kat, atipik duktal hiperplazi ve lobuler hiperplazi 4-5 kat, lobuler in situ karsinom ise 8-11 kat arttırmaktadır.
Genetik faktörler	Meme kanserine genetik eğilim oluşturan başlıca faktörler BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, p53 mutasyonu (örneğin Li-Fraumeni sendromu) ve PTEN (fosfataz ve tensin homologu) mutasyonlarıdır (örneğin Cowden sendromu).

Östrojen ve progesteron reseptörleri

Östrojen normal meme epiteli ve meme kanserinin gelişiminde anahtar rol oynayan hormondur; ayrıca östrojen düzeylerinin modülasyonu meme kanserinin tedavisinde bir köşetaşdır. Östrojen, meme epiteli hücrelerinde bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan 2 spesifik reseptörü (ER α ve ER β) ile etkileşime girerek etki etmektedir (8). ER α , ilk izole edilen östrojen reseptörüdür ve

meme kanseri ile yakından ilişkilidir; başlıca meme, uterus, over ve endometriumda eksprese edilmektedir. ER β ise vücutta daha yaygın olarak eksprese edilmesine karşın meme kanseri ile ilişkisi daha azdır (9). Pratikte “ER pozitif”liği aksi belirtilmedikçe “ER α pozitif”liği olarak bilinmektedir.

Meme kanserlerinin yaklaşık %70’ ı ER pozitifdir. ER pozitif tümörler ER negatiflere kıyasla daha yavaş büyüme paterni gösterirler ve daha iyi diferansiyedirler. Ayrıca selektif östrojen reseptör düzenleyicileri (SERM) ve antiöstrojen tedavi ile bu hastalarda hem nüksleri engellemek (adjuvan olarak kullanıldığında) hem de metastatik hastalarda sağkalımı uzatmak mümkündür. Buna karşın ER ekspresyonu ile karsinogenez arasındaki ilişki belirsizdir, çünkü ER pozitif hücreler normal meme epitelinde proliferasyon alan hücrelere bitişik olarak proliferasyon dışı durumda bulunmaktadır; bu da bir parakrin etkiyi düşündürmektedir. Son yapılan çalışmalarda, immunhistokimya (IHC) ile ER pozitif tümörlerde aslında hücrelerin çok küçük bir kısmının ER eksprese ettiğinin ve meme kanseri kök hücrelerinin ER eksprese etmediklerinin gösterilmesi bu “parakrin etki” hipotezini desteklemektedir (7).

Östrojen etkilerini hem genomik hem de genomik olmayan mekanizmalarla gerçekleştirmektedir. Genomik etki ligandına bağlanarak ER α dimerizasyonu yolu ile büyümeyi uyarıcı spesifik hedef genlerin (siklin D1 ve myc) transkripsiyonel regülasyonunu sağlaması şeklinde olmaktadır. ER α ’ nın genomik olmayan etkisi genomik etkisinden farklı olarak nükleus dışında ve son derece hızlı (östrojen maruziyetinden saniyeler veya dakikalar sonra) gerçekleşir ve membrana-bağlı ve/veya sitozolik ER α ’ nın hormon-bağımlı aktivasyonu sonucu olduğuna inanılmaktadır. Bu nüklear olmayan ER α etkisi çok hızlı bir şekilde önemli büyümeyi düzenleyici kinazların (EGFR ler, IGF-1R, c-src, shc ve PI3K’ in p85 regülatör alt ünitesi) fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. ER α ile bu büyüme faktörü reseptörleri

arasındaki ilişki iki yönlüdür; örneğin sürekli HER2 aktivasyonu ER α sinyalini arttırabilir ve antiöstrojen tedavilere yanıtızlılıkla ilişkili olabilir. Bu deneysel bulgu HER2/IGF-1R/EGFR aktivasyonunun antiöstrojen tedavilere kazanılmış ve de novo yanıtızlılıkla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (7).

Steroid reseptörlerinin genomik olmayan sinyali ve hücreseel lokalizasyonu belirleyen kimliği ve nasıl çalıştığı halen tam olarak bilinmemektedir. Membran ER'leri membran reseptör tirozin kinazlarını direkt veya indirekt olarak aktive ederek etki gösterirler. Nuklear ER'leri ise etkilerini iki büyük transkripsiyonel aktivasyon fonksiyonu (ligand-bağımlı AF-1 ve AF-2) ile ligand-bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak gerçekleştirirler. Bununla beraber son yapılan çalışmalarda klasik östrojen reseptörlerinin hem sitoplazmada hem plazma membranında (özellikle kaveolar domainlerde) yer alan translasyonel ER α varyantı olarak tanımlanabilecek küçük bir alt grubu daha belirlenmiştir. Genetik olarak klasik ER'leri ile ilişkisiz membran reseptörleri de bu grup içinde bulunabilir. İlginç olan nokta AF-1 domaininin çoğunu kaybetmiş bu ER α varyantının meme kanseri hücreleri gibi çeşitli östrojen hedef hücrelerinde bulunmasıdır. Genomik olmayan ER aktivitesinin meme kanseri hücrelerinin östrojenle uyarılmış büyüme ve hayatta kalmasına aracılık ettiği kanıtlanmıştır ve hem membran hem sitoplazmik ER'lerinin varlığı ve fonksiyonu biyokimyasal, immunhistolojik ve genetik yöntemlerle tespit edilebilmektedir (10).

Progesteron reseptörü (PR) ise 2 ayrı izoforma sahip bir östrojen düzenleyici gendir. PRA izoformu vücutta daha yaygın olarak eksprese edilmesine karşın, PRB meme kanserine daha spesifiktir. PR, ER pozitif tümörlerde değışken oranlarda eksprese edilmektedir ve bu değışkenliğin prognostik önemi vardır. ER pozitif/PR negatif tümörler 50 yaş üstündeki kadınlarda daha sıktır, daha anaploid olmaya eğilimlidir ve ERpozitif/PR pozitif tümörlere göre daha büyük tümör çapı ve daha sık nodal tutulumla

karakterizedir. Ayrıca ERpozitif/PR pozitif tümörlerin ER pozitif/PR negatif tümörlere göre antiöstrojen tedaviye yanıtı daha iyidir (11). Eskiden ER pozitif/PR negatif tümörlerde ER yolunun inaktif olduğuna inanılırdı (PR ER' nin downstream' i olduğu için). Ancak son prelinik ve klinik çalışmalardan edinilen bilgiler bu tümörlerin farklı biyolojiye sahip olduğunu, reseptör tirozin kinaz yollarının daha aktif olduğunu ve PR' lerinin ekspresyonunu azaltabildiklerin göstermiştir (12). Bu teori HER2 amplifikasyonun PR ekspresyonu ile ters orantılı olduğunu bildiren çalışmanın sonuçlarıyla da uyumludur (13). Ancak bir aromataz inhibitörü olan anastrozolün ER pozitif hastalarda tamoksifenden daha etkili olmasına ve aktivitesinin göreceli olarak ilk önce PR negatif hastalarda en yüksek görülmesine karşın (14), bu teori son zamanlarda konfirme edilmemiştir (15). Yine de bir aromataz inhibitörü (örneğin letrozol) ile HER2 blokajının (trastuzumab) klinik kombinasyonu sinerjistik olabilir (16).

ErbB2 (HER2/neu)

ErbB2 proto-onkogeni EGFR (ErbB1), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4)' ü içeren büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir ve bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar. Bu reseptörlerin ligandları heregulinler olarak adlandırılır. Heregulinler bir büyüme faktörü ailesidir ve ErbB3 ve ErbB4' e bağlanarak ErbB2 ile heterodimerizasyonu ve bunun sonucunda downstream sinyal iletimini başlatırlar. HER2 direkt olarak ligand bağlayamaz; aktivitesi için ligand bağlayan diğer büyüme faktörü reseptörleriyle heterodimerizasyona gereksinim duyar. Bunlar içerisinde HER3 en önemli heterodimerizasyon partneri gibi görünmektedir (17).

HER2 geni hücre büyümesi, bölünmesi ve onarımının kontrolünde rol oynar. Hücre membranına bağlı bulunan HER2 proteini sinyal kaskadını başlatır, böylece normal hücresel büyüme süreci başlamış olur. Normal hücrelerde HER2 geni 2 kopya halindedir ve hücre yüzeyinde 50.000 protein kopyası bulunur. Normal koşullarda her

17. kromozomda bir HER2 geni mevcuttur; bununla beraber meme kanseri geliştiğinde HER2 geni ek kopyalar üretmeye başlayabilir ve “amplifiye” olur. Çok sayıda HER2 gen kopyası, tümör hücrelerinin yüzeyinde HER2 proteini aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır (18). HER2 amplifikasyonu ve/veya protein aşırı ekspresyonu yeni tanı konmuş meme kanserli hastaların %20’ sinde bulunur ve HER2 düzeyi normal olan hastalarla karşılaştırıldığında daha agresif klinik seyir ve daha kısa genel sağkalım süresiyle beraberdir (19). Amplifikasyon, Ras-MEK ve Akt olarak bilinen reseptör tirozin kinaz sinyal ileti yolunun sürekli uyarılmasına yol açar. Sıklıkla kinaz domaininde aktive edici mutasyonlar bulunan akciğer kanserindeki EGFR amplifikasyonlarının aksine, meme kanserlerinde mutasyon saptanmamıştır (20). Meme kanserinde HER2’ nin bir onkojen olarak tanımlanması, bu hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini sağlamıştır. Trastuzumab, HER2’ nin ekstrasellüler domainine bağlanarak etki gösteren bir humanize monoklonal antikordur. HER2 aşırı ekspresyonu olan hastalarda tek başına kullanıldığında klinik yanıt sağladığı görülmüştür, kemoterapiyle kombine edildiğinde sağkalımı uzatmaktadır, adjuvan tedavide kullanıldığında ise nüks oranlarını %50 azaltmaktadır (21). Son zamanlarda geliştirilen küçük molekülü bir reseptör tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olan Lapatinib’ in ise metastatik, HER2 pozitif meme kanserli hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (22). Ancak HER2 pozitif meme kanserli hastaların tümü trastuzumab veya lapatinibe yanıt vermemektedir. AntiHER2 tedaviye direncin mekanizmalarını açıklığa kavuşturmaya yönelik çalışmalar sürmektedir. Örneğin artmış insülin-benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) düzeyleri trastuzumabın yaptığı HER2 blokajını bypass edebilir ve Akt’ ı aktive edebilir (23). Benzer durum bir tümör supresör gen olan PTEN eksikliğinde de söz konusudur (24). Ayrıca HER2’ nin ekstrasellüler domaini eksik,

ancak kinaz aktivitesi devam eden bir formu son zamanlarda tanımlanmıştır ve trastuzumab direnciyle ilişkili bulunmuştur (25).

HER2' yi içeren amplikon sıklıkla terapötik etkinliği etkileyen ek genler bulundurmaktadır. Başlangıçta HER2 pozitif hastalığın antrasiklinlere daha hassas olduğu düşünülmesine karşın, son zamanlarda edinilen bilgiler bu hassasiyetin amplikonda bulunabilen topoizomeraz II geni ile belirlendiğini düşündürmektedir (26). AntiHER2 tedaviye direncin daha iyi anlaşılabilmesi için hem hücre seri panellerine hem de antiHER2 tedavi alan hastalardan elde edilen dokulara modern genom analiz yöntemleri uygulanmaktadır. Bugün için küçük moleküllü insülin-benzeri büyüme faktörü IGF inhibitörleri, fosfatidilinozitol 3'-kinaz (PI3K) ve Akt kinaz inhibitörlerinin meme kanserinde klinik gelişimi ilerlemektedir ve bunların in vitro olarak antiHER2 tedavi ile sinerjistik etkileri gösterilmiştir (27).

PI3K ve PTEN

Fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3), reseptör tirozin kinaz sinyaline cevap olarak PIP3 kinaz (PI3K) tarafından oluşturulan bir ikincil mesaj ileticidir. PIP3, Akt'ı ve diğer ilişkili yolları aktive ederek proliferasyonu uyarır ve apoptozisi inhibe eder. Meme kanserlerinin yaklaşık %25' inde PI3K' ın p110 katalitik alt ünitesinde (PIK3CA) aktive edici mutasyonlar bulunmaktadır (28). Bu sinyal, bir tümör supresör gen olan PTEN' in fosfataz etkisi ile inaktive edilir.

Germline PTEN mutasyonları Cowden Sendromu olarak bilinen ve meme, uterus, tiroid ve cilt neoplazmları ile karakterize, herediter bir kanser predispozisyon sendromuna yol açar (29). PTEN meme kanseri dahil olmak üzere insanda görülen tümörlerin büyük bir kısmında mutasyonlar veya daha fazla sıklıkla metilasyona bağlı epigenetik sessizleşme sonucu inaktive hale gelmektedir (30). PTEN kaybı genetik instabilite ile ilişkilidir ve PTEN eksikliği bulunan meme kanserlerinde anaploidi sıklığı

yüksektir (31) Ayrıca PTEN eksikliği antiHER2 tedaviye azalmış yanıt oranı ile birlikte (24). Son yapılan çalışmalarda PTEN durumu ile PI3K mutasyonları arasındaki ters orantılı bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. Dahası, PI3K mutasyonları HER2 pozitif veya ER pozitif tümörlerde 2 kat daha sık görülmektedir; bu da intakt PTEN' in etkisinin üstesinden gelebilmek için birden fazla Akt upstream aberrasyonunun gerekli olduğunu düşündürmektedir (32). PI3K mutasyonlarının trastuzumab ve lapatinible HER2' ye yönelik tedavilerin klinik aktivitesi üzerine etkileri günümüzde bir çok araştırmanın başlıca konusudur.

MEME KANSERİ GENOMU (7)

Kanser genomlarındaki genetik aberasyonların (mutasyonlar, delesyonlar ve amplifikasyonlar) aydınlatılması kanser patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını, böylece tedaviye yönelik uygun hedeflerin saptanmasını sağlayacaktır. Normal insan genomunun DNA dizisinin saptanması ile kanser genomlarına yönelik daha ayrıntılı bir analize girişilmiştir. Başlangıçta araştırmalar tirozin kinazlar üzerine yöneltilmiştir ve sonrasında tüm genomları içine alacak şekilde genişletilmiştir. En iyi çalışılan ve açığa çıkarılan 21.000 insan geninin ayrıntılı sekans analizi sonuçları 2006' da yayınlanmıştır ve bunların içind 11 kolon kanseri ve 11 meme kanseri örneği de bulunmaktadır. Bu tarama ile hem daha önceden meme kanseriyle ilişkili olduğu bilinen kanser genleri (p53 ve BRCA1 gibi) yeniden bulunmuş, hem de önceden tespit edilmemiş kanser genleri keşfedilmiştir. Bu etkileyici çabalar meme kanserinin ortalama 90 mutant gen taşıdığını, ancak bu genlerin küçük bir kısmının (yaklaşık 12 tanesinin) neoplastik sürece yol açtığını göstermiştir. Ne yazık ki fonksiyonel olarak önemli mutasyonlar tümörden tümöre değişmektedir, bu da tedavi geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Buna karşın genler fonksiyonel gruplar halinde incelendiğinde neredeyse tüm meme tümörü örneklerinde sinyal ileti yollarında ve transkripsiyon faktör genlerinde mutasyonlar

bulunmuştur. Edinilen bilgilerin artması ve tümörlerin genetik karakteristiklerinin daha iyi ortaya konması, şüphesiz yakın gelecekte bireyselleştirilmiş yeni biyolojik ve terapötik bakış açıları gelişimini sağlayacaktır.

MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER PROFİLİ

RNA türlerinin göreceli çokluğunun biyoinformatik yaklaşımlarla kombine edilerek eş zamanlı olarak genomik tayini, binlerce genin sürekli ekspresyonu temelli moleküler klasifikasyonların gelişimine yol açmıştır. Tümörler altta yatan biyolojik farklılıklara göre ayrılan transkriptlere veya tedaviye cevap ya da prognoz gibi bir sonlanım noktasına göre sınıflandırılabilir. Bu çalışmaların ilki 534 genden oluşan ve 5 biyolojik meme kanseri alt tipini tanımlayan bir “intrinsik gen listesi” ortaya koymuştur (33). Bu alt tipler “Luminal A” (ER ve/veya PR pozitif/HER2 negatif), “Luminal B” (ER ve/veya PR pozitif/HER2 negatif), “Bazal alttip veya üçlü negatif” (ER ve PR negatif/HER2 negatif, sitokeratin 5/6 pozitif), “HER2 pozitif” (ER ve PR negatif, HER2 pozitif), “Meme-benzeri” (normal meme dokusuna benzer özelliklere sahip) alttip.

Diğer çalışmalar ER pozitif ve ER negatif tümörler arasında geniş ölçekli gen ekspresyon farklılıkları olduğunu doğrulamıştır ve bu kategorilerde ek moleküler alt kümeleri göstermişlerdir. Bu moleküler meme kanseri klasifikasyonu mikroarray platform tipinden bağımsızdır ve çeşitli alttipler genel prognozla koreledir, bu yüzden de geçerliliği güçlüdür. Bazal tip meme kanserleri sıklıkla premenapozal kadınlarda görülen, yüksek gradlı, mitotik indeksi ve ki-67 skoru yüksek, genellikle büyük çaplı tümörlerdir; erken uzak metastaz yapmaya eğilimlidirler. Kemoterapiye duyarlıdır, ancak prognozları kötüdür (34). Luminal-tip iyi/orta derecede diferansiye ve genellikle küçük çaplı tümörleri içerir (34). Luminal A en iyi prognoza sahip tiptir, ancak son zamanlarda yapılan bir çalışmada en kötü uzun dönem sağkalıma sahip tümör tipinin luminal B olduğu bildirilmiştir (35). HER2 pozitif tip genellikle postmenapozal

kadınlarda görülmekte, sıklıkla lenf bezi metastazı veya uzak metastazla seyretmektedir (34). Sonuçta meme kanserinin heterojen ER ve HER2 ekspresyonu gösteren kompleks bir hastalık olduğu, moleküler ve klinik olarak birbirinden farklı birkaç tipten oluştuğu söylenebilir. Gen ekspresyon çalışmaları evrimleştikçe daha farklı alttipler ve sınıflandırmaların ortaya çıkacağı beklenmektedir. Nitekim son zamanlarda “düşük-claudin” olarak isimlendirilen farklı bir alttip tanımlanmıştır (36). Bu alttip; claudin 3, 4, 7 ve e-cadherin gibi hücreler arasında bağlantıyı sağlayan transmembran proteinleri ve adezyon moleküllerinin ve luminal diferansiyasyon belirteçlerinin eksikliğiyle karakterizedir; buna karşın yüksek oranda mezenkimal ve meme kök hücresi benzeri özelliklere sahiptir. Klinik olarak düşük-claudin tip tümörlerin çoğunun kötü prognozlu ERnegatif/PR negatif/HER2 negatif tümörlere benzediği ve yüksek oranda metaplastik ve meduller diferansiyasyon sergilediği belirtilmiştir (36).

Son zamanlardaki bazı yayınlar hem “intrinsik gen listesi”ne hem de klinik sonuç bilgisine karşı çıkmaktadır ve yüksek düzeydeki DNA amplifikasyonlarının tanımlanmasının HER2’ ye benzer şekilde terapötik hedefler olarak yararlı olabileceğini ileri sürmektedirler (37). Bununla beraber intrinsik gen listesi ve kaynakları prognozla korele olsa dahi, bu bilgi mevcut korelasyonun klinik karar verme aşamasında gerekli duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu anlamına gelmemektedir. Erken evre meme kanserli birçok hasta adjuvan kemoterapi almasına karşın, çok küçük bir kısmı tedaviden direkt fayda görmektedir. Klinikle ilgili çözüm bekleyen en önemli sorulardan biri bu erken evre meme kanserli hastalar içerisinde kimlerin adjuvan kemoterapiden yarar göreceğidir.

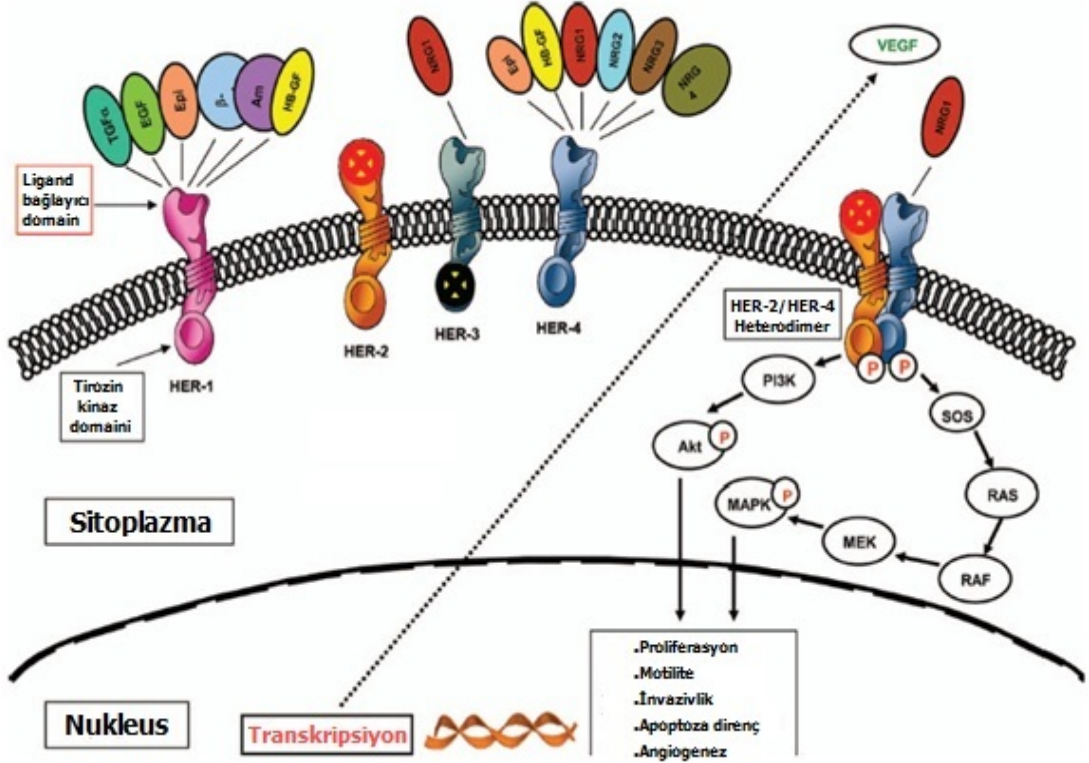
Retrospektif olarak mikroarray datadan ve bazı vakalarda prospektif olarak geçerliliği onaylanmış ek datasetlerinden elde edilen birkaç genden oluşan tahmini skorlama sistemleri klinik sonuçlarla korele bulunmuştur ve geleneksel histopatolojik

belirteçlerden daha doğru sonuç vermiştir. En iyi bilinen örnekler 70 genden ve 21 genden oluşan panellerdir (38, 39). Her iki analizde de PCR tekniği kullanılarak RNA düzeyleri ölçülmektedir ve ikisi de FDA tarafından onay almışlardır. 21 genden oluşan test ticari olarak kullanıma sunulmuştur (Oncotype Dx, Genomic Health). Bu test 16 hedef transkript (ve 5 referans transkript) içerir, bunların 3' ü ER, PR ve HER2' dir. Bununla beraber Ki67 ve siklin B1' i de içeren 5 genden oluşan bir ek “proliferasyon grubu” vardır ve “rekürrens skoru”nu belirlemek için bir formül oluşturulmuştur. Bu rekürrens skoru sürekli bir risk değişkeni sağlamasına karşın, klinik kullanımda bu risk 3 kategoriye indirgenmektedir: düşük, orta ve yüksek (bu şemaya göre HER2 pozitif bir tümörün düşük sınıflandırılabilmesi pek olası değildir). 70 genden oluşan testin ER pozitif nod negatif hastalardan adjuvan tedaviden fayda görecektir hastaları belirleme yeterliliği ise prospektif MINDACT (Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy) çalışmasında test edilecektir (40). Benzer şekilde Trial Assigning Individualized Options for Treatment (Rx) (TAILORx) çalışmasında teste göre “orta risk” grubundaki hastalarda adjuvan kemoterapinin yararı prospektif olarak değerlendirilecektir (41); “düşük risk” grubundaki hastalara tedavi verilmeyecek, “yüksek risk”li hastaların ise tümü tedavi edilecektir. Bu ölçümler bireyselleştirilmiş adjuvan tedaviye geçiş için önem taşımaktadır. Ancak sürekli değişken risk değerlendirmesi (Oncotype rekürrens skoru vakasında olduğu gibi), şimdiye kadar ikili şekilde oluşturulan (örneğin ER pozitifliği antiöstrojen tedaviyi belirler, HER2 pozitifliği antiHER2 tedaviyi belirler) klinik karar verme sürecini kompleks hale getirmektedir.

HER2 BİYOLOJİSİ

HER2, 17. kromozomun uzun kolunda yer alan HER2/neu (c-erbB-2) protoonkogeni tarafından kodlanan, moleküler ağırlığı 185 kD olan ve 1255

aminoasitten oluşan bir transmembran glikoproteinidir. Şu ana kadar HER ailesinin 4 üyesi tanımlanmıştır: HER1 (EGFR, erbB1), HER2 (erbB2, HER2/neu), HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4). Bunların dördü de hücre membranında monomerler halinde yerleşmiş transmembran reseptörleridir ve yapıları sisteinden zengin 2 ekstrasellüler domain (ligand bağlama ve reseptör dimerizasyon kabiliyetine sahip), bir lipofilik transmembran domaini ve regülatör karboksil-terminal bölgesi içeren bir intrasellüler tirozin kinaz domaininden oluşur. Ligand ekstrasellüler domaine bağlandığı zaman HER proteinleri homodimerizasyona (örneğin HER1-HER1) veya heterodimerizasyona (örneğin HER1-HER2) giderler ve intrasellüler domainleri transfosforilasyona uğrar. Şu ana kadar HER2 için spesifik bir ligand tespit edilememesine rağmen, HER2' nin diğer HER reseptörleriyle heterodimer oluşturarak sinyal iletiminin başlatılmasına katılan bir ko-reseptör gibi işlev gördüğü saptanmıştır (HER3' ün kinaz aktivitesi yoktur. HER3 homodimerleri sinyalizasyon oluşturamazken, HER2/HER3 kompleksinin fonksiyonel sinyalizasyon oluşturabildiği görülmüştür. HER2-HER3 heterodimeri meme kanserinde en önemli ve güçlü mitojenik kombinasyondur) (42). HER1 için bilinen başlıca ligandlar EGF, TGF α , amfiregülin (AR), heparin-bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), betasellülin (β -cel) ve epiregülin (Şekil 1) (43). HER3 ve HER4 birçok heregülini veya neu diferansiyasyon faktörlerini (NDF) bağlar (43).



Şekil 1 - HER gen ailesi reseptör tirozin kinazları ile intrasellüler sinyal yolları arasındaki ilişki. HER ailesi reseptörleri hücre yüzeyinde yer almaktadır. Aktive olan HER reseptörleri diğer biyolojik yolların üyelerinin downstream yollarını stimüle ve inhibe ederek fonksiyon gösterirler. HER2 ligandla aktive olmaz ve HER3' ün bir tirozin kinaz domaini eksiktir. HER2-aracılı sinyal; hücre proliferasyonu, motilite, apoptoza direnç, invazivlik ve angiogenezele ilişkilidir.

Kısaltmalar: Amp, amfirogulin; EGF, epidermal büyüme faktörü; Epi, epinefrin; HB-GF, heparin bağlayıcı-büyüme faktörü; MAPK, mitogen-aktive protein kinaz; MEK, MAPK/ekstrasellüler sinyal-ilişkili kinaz-kinaz; NRG, neuregulin; PI3K, fosfatidil inozitol 3' kinaz; SOS, son of sevenless; TGF α , dönüştürücü büyüme faktörü α ; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü.

HER2' nin fosfotirozin aktivasyon bölgesi, STAT transkripsiyon faktörleri, enzimler (SHP-2/PTP-2c tirozin fosfataz gibi) ve adaptörler (Shc, Grb2, p85 gibi) gibi SH2 ve PTB domaini-içeren sinyal moleküllerine docking (kenetlenme) bölgeleri olarak hizmet etmektedir. HER2' nin moleküler partnerleri Shc, Grb2, Crk adaptör protein ailesi, fosfolipaz C γ (PLC γ) ve potansiyel sinyal baskılayıcı proteinlerdir (CHK ve Dok-2 gibi). Bu sinyal adaptörlerinin aktivasyonu bir sinyal kaskadında birincil etkinliktir; ardından hücre proliferasyonu, diferansiasyon, hayatta kalma ve migrasyon

gibi downstream hücresel fonksiyonlar başlatılır. Örneğin HER2' nin Shc ve Grb2' nin aktivasyonunu sağlayarak Ras/Raf/ERK sinyal kaskadını aktive ettiği bilinmektedir. Bu da sırasıyla Gab2/SHP-2 kompleksini ve HER3 tirozin rezidülerinin fosforilasyonu yoluyla PI3K/Akt yolunu aktive eder. Böylelikle transkripsiyon faktörleri ve hücre siklusu düzenleyicileri gibi nükleer efektörler ileri derecede aktive olur. HER2 sinyali ayrıca artmış matriks metalloproteinaz aktivitesi ile de ilişkilidir, bu da tümorojenik ve metastatik potansiyeli artırır. Bu etkileri dışında HER2 vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) için potent bir uyarıcıdır ve tümör vaskülaritesini artırır. Bir transmembran proteini olarak HER2 fizyolojik koşullarda proteolize uğrayabilir. Bu proteoliz sonucu 97 ve 115 kD' luk domainler ayrılır ve 2 reseptör fragmanı meydana gelir. p105 (solubl HER2, sHER2) ekstrasellüler kompartmanda serbestleşir, p95 ise plazma membranında kalır. p95 kısmı artmış tirozin kinaz aktivitesiyle ilişkili olabilir ve sinyal potansiyelinin artmasından sorumlu olabilir. p95 ekspresyonu ayrıca meme kanserinde bağımsız bir prognostik faktördür ve HER2 pozitif meme kanserli hastalarda kötü prognozla beraberdir. Tüm bu protoonkojen karakteristikleri HER2' yi antitümöral tedavi için ideal bir hedef haline getirmiştir (42)

HER2 DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ (43,44)

HER2 durumunu değerlendirmeye yönelik testler tablo 2' de gösterilmiştir.

Taze doku gerektiren veya tümör hücreleriyle normal hücrelerin birbirine karışmasından dolayı dilüsyon gerektiren tüm-doku ekstraksiyon yöntemleri (Southern blot, ELISA ve PCR gibi) pratikte yerini IHC ve FISH gibi doku-temelli yöntemlere bırakmıştır. IHC ve FISH bugün için formalinle fikse edilmiş ve parafinle kaplanmış doku bloklarında kolaylıkla uygulanabilen ve HER2 analizi için en sık başvuru yöntemleridir.

IHC protein-temelli bir testtir ve hücre yüzeyindeki HER2 protein reseptörlerinin toplam miktarını ölçer. Bunun için hücre yüzeyi HER2' nin ekstrasellüler veya intramembranöz domainlerine karşı geliştirilmiş bir antikorla kaplanır. Patolog hücredeki renk değişikliklerinin derecesine bakarak HER2 protein düzeylerini 0, 1+, 2+ veya 3+ olarak belirler:

0 (negatif): Boyanma yok veya tümör hücrelerinde %10' dan az membranöz boyanma.

1+ (negatif): Tümör hücrelerinde %10' dan fazla ancak zorlukla görülen membranöz boyanma.

2+ (borderline): Tümör hücrelerinin %10' undan fazlasında zayıf-orta derecede tüm membranöz boyanma.

3+ (pozitif): Tümör hücrelerinin %10' undan fazlasında kuvvetli tüm membranöz boyanma.

Tablo 2 – HER2 durumunu değerlendirmeye yönelik yöntemler

<p>1. DNA düzeyinde ölçüm</p> <ul style="list-style-type: none"> • Floresan in situ hibridizasyon (FISH), kromojenik in situ hibridizasyon (CISH), silver in situ hibridizasyon (SISH) • Southern Blot • Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) <p>2. RNA düzeyinde ölçüm</p> <ul style="list-style-type: none"> • Northern Blot <p>3. Protein düzeyinde ölçüm</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enzim ilintili immun test (ELISA) • Western Blot • İmmunhistokimya (IHC)
--

IHC yönteminin avantajları formalinle fikse edilmiş ve parafinle kaplanmış doku bloklarında kolaylıkla uygulanabilmesi ve ucuz olmasıdır. Dezavantajları ise doku fiksasyonu, işlenmesi, kontroller ve skora sürecindeki farklılıklardır. Fiksasyon protokolleri, kullanılan antikolar ve boyama prosedürleri IHC' nin başarısını etkileyebilir. Analiz öncesi doku hazırlanması ve fiksasyondaki değişkenlikler immunoreaktiviteyi etkileyebilir. FDA tarafından onay verilmiş 2 antikor sistemi mevcuttur:

1. Pathway.....Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ

(CB-11 monoklonal antikor kullanılmaktadır)

2. Herceptest....DAKO

(Tavşan monoklonal antikor kullanılır)

FISH floresan molekülleriyle kaplı bir DNA probuyla yapılan bir tür hibridizasyondur. "In situ" kelimesi hibridizasyonun mikroskop lamına fiske edilen hücrelerin nükleusları içinde meydana gelmesini ifade etmektedir. Lamdaki hücreler ısıtılarak DNA' nın çözülmesi ve DNA probunun girişi sağlanır. Prob eklendikten sonra hücreler soğutulur ve DNA probunun komplementer hedef DNA ile hibridize olması sağlanır. Bir kez hibridize olunca probdaki floresan moleküller kromozomdaki hedef DNA' yı açık bir şekilde gösterir, böylece HER2 gen sayısı, yani HER2 gen amplifikasyonu saptanabilir. İşlemden boyanma yoğunluğu açısından subjektif yorum söz konusu değildir. Doku hazırlanması ve fiksasyonla ilişkili problemler daha az rastlanmasına rağmen, bu teknik rutin pratiğe uygun değildir (floresan mikroskopi). Yöntemin diğer dezavantajları özel ekipman, zaman ve beceri gerektirmesi ve pahalı oluşudur. Farklı problemlerin kullanıldığı başlıca 2 sistem mevcuttur:

1. Path Vision (Vyses): Abbot tarafından piyasaya sürülmüştür ve 2 DNA probunun kullanılmaktadır. Biri HER2 genini tanımlarken diğeri

kromozom 17 sentromeri için spesifiktir. Gen ve sentromer sinyalleri 60 nukleusta saptanır ve HER2 geni/kromozom 17 sentromer oranı hesaplanır. Oran 2 veya daha fazla ise HER 2 amplifikasyonu mevcut (FISH pozitif) demektir.

2. Inform HER2 (Ventana): Mutlak HER2 gen kopya sayısını ölçmek için tek prob kullanılmaktadır. Pathway sistemi ile arasındaki temel fark kromozom 17 için bir prob bulunmamasıdır. Kromozom 17 polizomu ile HER2 amplifikasyonunu birbirinden ayırdetmek için dual problu FISH tekniği kullanılmalıdır. Standard FISH yöntemi sadece HER2 amplifikasyonu olup olmadığını göstermekle kalmaz, ayrıca amplifikasyonun derecesini de belirtir. Buna göre kopya sayısı 1-5 arasında ise negatif , 6-10 arasında ise düşük düzeyde, 10' dan fazla ise yüksek derecede amplifikasyondan sözedilir.

HER2 durumu, IHC ile protein aşırı ekspresyonu açısından ya da FISH ile gen amplifikasyonu açısından değerlendirilerek klinik karar verme aşamasına dahil edilmelidir. IHC ve FISH ölçümleri birbirleri ile iyi düzeyde korelasyon gösterirler. Bununla beraber, FISH trastuzumab yanıtını belirlemede IHC' dan daha prediktiftir. Sonuç olarak, FISH yöntemi IHC (2+) sonuçlarını konfirme etmede kullanılmaktadır.

Real time PCR (RT-PCR) tekniği periferik kan ve kemik iliği örneklerinde HER2/neu mRNA' sını tespit etmek için sık olarak kullanılmaktadır. RT-PCR sonuçları IHC sonuçlarıyla karşılaştırıldığında gen amplifikasyonu durumuyla (FISH) daha güçlü korelasyon göstermektedir, ancak sonuçlar genellikle sağkalımı predikte etmekte başarısızdır. RT-PCR rutin ve sık uygulanabilir bir laboratuar tekniği olarak kabul gördüğü zaman HER2/neu durumunun değerlendirilmesinde RT-PCR kullanımı muhtemelen artacaktır. HER2/neu mRNA ekspresyon düzeylerini saptamaya yönelik

alternatif bir yöntem de cDNA mikroarray-temelli testtir. Bu yöntemin avantajı HER2 mRNA düzeyiyle birlikte HER2 sinyal yolunun downstreamini de değerlendirmeye olanak vermesidir. Bu teknikle HER2 ile ilgili diğer yollar (ER yolu gibi) da eş zamanlı olarak değerlendirilebilir. Doku mikroarrayi ile multipl örneklerin daha fazla miktarda analiz edilmesi mümkündür. Ayrıca doku mikroarrayi ile HER2 analizi donör doku bloklarından elde edilen IHC ve FISH sonuçlarıyla mükemmel korelasyon gösterir.

PI3K/AKT SİNYAL YOLU

Hücre sinyalizasyonunu, büyümesini, proliferasyonunu ve apoptozunu regüle eden yollar meme kanserinin moleküler biyolojisinde temel olarak yer almaktadır. Bu yollar arasında PI3K/Akt yolunun meme kanseri hücrelerinin büyüme sürecinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Bu yol hücre siklusu, protein sentezi, metabolizma, motilite ve angiogenezis gibi önemli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır (45).

PI3K' ler bir lipid kinaz ailesidir 3 ayrı tipi tanımlanmıştır. Klas I PI3K' ler 2' ye ayrılmaktadır. Klas IA PI3K' ler hücre bölünmesi ve onkogenezele ilişkili görünen tiptir ve bu grupta p110 α ve onun regülatör alt ünitesi olan p85 bulunmaktadır. Klas IB PI3K, p101 ve p110 γ ' dan oluşmaktadır. Klas II PI3K' ler monomerik katalitik izoformlardır. Son olarak tek tanımlanmış klas III üyesi Vps34' tür. Klas II ve III PI3K' lerin onkogenezele rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir (45).

PI3K yolunu besleyen upstream reseptör tirozin kinazlar EGFR ailesini, platelet kökenli büyüme faktörü reseptörünü, insülin reseptörlerini ve IGF-1R' lerini içerir. Bir büyüme faktörünün reseptör tirozin kinazı ile birleşmesi ve reseptör tirozin kinazın uyarılması, tirozin kinaz domaininde bulunan p85 ile interaksiyon ile klas IA PI3K' lerin aktivasyonu için tipik bir başlatıcı rolü oynar. Bu ya direkt olarak (mesela HER3 ile) ya da adaptör moleküller yoluyla (örneğin insülin reseptör substratı-1, IRS-1)

indirekt olarak olur. Bağlanma, p110 üzerinde p85' in inhibitör etkisini ortadan kaldırır ve PI3K' ın tam aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive PI3K, substratı olan fosfatidilinozitol 4,5–bifosfatı [P(4,5)P2] fosfatidilinozitol 3,4,5–trifosfata [PI(3,4,5)P3]' e dönüştürür. PI(3,4,5)P3 (PIP3) Akt ve fosfatidil inozitol bağımlı kinaz 1' i (PDK1) yakın ilişki içine sokar; böylece Akt' ın kinaz domain' inde bulunan treonin-308 pozisyonunda fosforilasyonuna izin veren bir kenetlenme bölgesi olarak rol oynar. TOR-rictor kompleksi (mTORC2) ayrıca Akt' a helikal domainindeki serin-473 pozisyonunda bir fosfat grubu sağlar. Her iki durum da Akt aktivasyonu için gereklidir (46).

Akt bir serin/treonin kinazdır ve anahtar hücrenel süreçleri etkileyen çok sayıdaki downstream efektörleri ile PI3K yolunun ana medyatörüdür. Hücre içinde farklı lokalizasyonlarda bulunur ve hücrenel işleyişlerin düzenlenmesinde farklı aktiviteleri vardır. Akt hücre membranında bulunduğu zaman yukarıda da belirtildiği gibi PDK1 ve mTORC-2 tarafından treonin-308 ve serin-473 pozisyonunda fosforillenir. Aktive Akt sitoplazma ve nukleusa hareket ederek farklı hücrenel fonksiyonlarda yer alan hedef proteinleri fosforiller ve aktive eder (45,46)

Akt, aynı zamanda ERK tarafından da module edilen bir kompleks olan mTORC-1' i de aktive eder, mTORC-1 da ribozomal p70S6 kinaz (S6K) ve ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E (eIF4E)' yi düzenleyerek protein sentezi ve hücre büyümesini stimule eder. Akt ayrıca hücre siklusu uyarıcı proteinlerini (c-myc ve siklin D1) arttırarak ve hücre siklusu inhibitörlerini (p27, p21 ve GSK3) inaktive ederek hücre siklusu progresyonunu ve proliferasyonunu arttırır. Bunun yanı sıra, Akt proapoptotik genleri (FasL ve Bim) ve proteinleri (BAD ve BAX) inhibe ederek, antiapoptotik proteinleri (NF- α K) ise aktive ederek, tümör baskılayıcı protein p53' ün degradasyonunu arttırarak programlı hücre ölümünü sınırlandırır ve hücrenin hayatta

kalma kapasitesini arttırır. Transkripsiyon baskılayıcı Snail' i upregüle ettiğinin gösterilmesi, Akt' ın epitelyal-mezenkimal geçişin indüksiyonunda ve invaziv özelliklerin ortaya çıkışında rol oynadığını düşündürmektedir. Akt/mTORC-1 aktivasyonu angiogenezin temel elemanları olan hipoksiyle uyarılan faktör-1 (HIF-1) ve VEGF' nün ekspresyonunu arttırır, ayrıca doku spesifik metastazın gelişiminde temel rol oynayan bir kemokin reseptörü olan CXCR4' ün de hücrel ekspresyonunu uyarır (46).

PI3K/Akt yolu aktivitesini düzenleyen çeşitli feedback inhibitör mekanizmalar tanımlanmıştır. SHIP fosfatazları PI3P' ın PI(3,4)P2' ye dönüşümünü sağlayarak sinyalizasyonu durdurabilir. İkinci mekanizma ise bir tümör baskılayıcı ve dual fosfataz olan ve hem lipid hem de protein yapıdaki substratları defosforile eden PTEN' i içermektedir. PTEN PIP3' den bir fosfat çıkarılmasını sağlayarak onu orijinal PI(4,5)P2 formuna dönüştürür, böylelikle PI3K fonksiyonlarını antagonize eder ve Akt aktivitesini negatif yönde düzenler. Son zamanlarda üzerinde en çok durulan mekanizma ise bir mTOR efektörü olan S6K' nın, IGF-1 reseptörü ile PI3K' i birbirine bağlayan adaptör molekülünden biri olan IRS1' in ekspresyonunu inhibe etmesidir. Bu etki direkt gibi görünmektedir ve IRS1' in insülin reseptörü ile ilişki kurabilme yetisini engellemektedir. Sonuçta insülin/IGF-1 reseptör stimülasyonu devam etmesine rağmen PI3K yoluna daha fazla uyarı girişi engellenmektedir (45,46).

PI3K yolu tüm kompleksliğine ek olarak diğer hücrel sinyal ağlarıyla da yaygın etkileşim içindedir. Örneğin mTOR, S6K-IRS1 feedback döngüsü yoluyla ve mTORC2 aracılı Akt-Ser473 fosforilasyonu yoluyla PI3K sinyaline müdahale edebilmektedir. Tümör baskılayıcı p53 aktivasyonu hem PTEN' i arttırır hem de p110 ekspresyonunu azaltır. Dahası, p53 degradasyonu PTEN tarafından PI3K antagonizması yoluyla indirekt olarak azaltılabilmektedir. Tüm bu etkileşimler genotoksik etkilerin varlığında

hücreyi devam eden DNA replikasyonuna karşı korumaktadır. Son olarak aktive GTP-bağlı RAS proteinleri p110' u direkt olarak bağlayarak PI3K yolunu kontrol eder (46).

TRASTUZUMAB

HER2 reseptörlerinin meme kanseri olgularının %25-30' unda aşırı eksprese edildiğinin ve bu aşırı ekspresyonun hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımda azalmayla ilişkili olduğunun gösterilmesi bu onkoproteine yönelik hedefli tedavilerle ilgili araştırmalara hız kazandırmıştır (47). HER2' nin 621 aminoasitten oluşan ekstrasellüler bölgesi 4 farklı domaini ile immunoterapi için ideal bir hedef olarak düşünülmüştür. Bu amaçla HER2' nin ekstrasellüler bölgesine karşı geliştirilmiş humanize, rekombinant bir monoklonal antikor olan Trastuzumab (rhumAb 4D5), HER2 aşırı ekspresyonu olan metastatik meme kanserinin tedavisinde FDA tarafından ilk onayı alan hedefe yönelik ajandır. Yapısında HER2' nin ekstrasellüler domaininin juxtamembran kısmına bağlanan 2 antijen spesifik bölge içermektedir. Antikoron kalan kısmı ise bir Fc kısmı bulunan insan murin IgG' sidir (4D5). Preklinik çalışmalarda trastuzumabın çeşitli antineoplastik ajanlarla beraber kullanıldığında additif sitotoksik aktivite ve sinerjistik antitümöral etki gösterdiği saptanmıştır (48).

TRASTUZUMABIN ETKİ MEKANİZMALARI

HER2 aşırı ekspresyonu olan meme kanserinde trastuzumabın nasıl etki ettiği kesin olarak bilinmemekle birlikte yapılan in vitro ve in vivo modellenen deneysel çalışmalarda çeşitli moleküler ve hücresel etki mekanizmaları tanımlanmıştır (Tablo 3).

1. HER2 proteininin internalizasyonu ve degradasyonu

Trastuzumab HER2' ye bağlanarak PI3K ve MAPK kaskadları yoluyla olan sinyal iletimini azaltmaktadır. Azalmış reseptör sinyali, trastuzumab aracılı HER2 internalizasyonu ve degradasyonuna bağlı olabilir. Drebin ve Hudziak' ın çalışmalarında anti-HER2 monoklonal antikorların hücre yüzeyindeki HER2 protein

ekspresyonu düzeyini azalttığını saptanmıştır (49,50). Buna karşın bazı çalışmalarda trastuzumab tedavisine yanıt olarak HER2 reseptör düzeylerinin değişmediği gösterilmiştir (51). Trastuzumaba bağlı HER2 düzeyindeki azalmanın mekanizması tam olarak anlaşılmasına karşın endositik internalizasyonun ve degradasyonun akselerasyonu yoluyla olduğu düşünülmektedir (52).

Tablo 3- Trastuzumab' ın moleküler ve hücrel etki mekanizmaları

1. HER2 proteininin internalizasyonu ve degradasyonu
2. HER2 extrasellüler domaininin proteolitik yıkımının blokajı
3. p27 düzeylerinin ve p27-CDK2 interaksiyonunun artırılarak CDK2 aktivitesinin azaltılması
4. İntrasellüler sinyal iletiminin inhibisyonu
5. İmmun-aracılı yanıt (Antikor-bağımlı hücrel sitotoksosite)
6. Tümöre bağlı angiogenezin inhibisyonu
7. DNA hasarının onarımının inhibisyonu

Kumar ve arkadaşları trastuzumaba bağlı büyüme inhibisyonunun reseptör baskılanmasından ziyade HER2 fosforilasyonunun azalmasına bağlı olduğunu ve bunun ligand bağımlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (53). Buna karşın trastuzumabın HER2 düzeyini ve dolayısıyla homodimer düzeyini düşürerek fosforilasyonu azaltması da mümkündür. Fosforilasyondaki azalma HER2 reseptör düzeyindeki düşüşten daha hızlı ve önce olmaktadır, çünkü HER2 homodimer sayısındaki azalma mutlak sayıdan ziyade HER2 yoğunluğunun miktarındaki azalma şeklinde olmaya eğilimlidir (52). Sliwowski ve arkadaşları bu bulguların ışığında trastuzumabın HER2 homodimerizasyonunu ve otofosforilasyonunu indüklediğini, ancak bunun downstream yolların aktivasyonu ile

sonuçlanmadığını belirtmişlerdir (54). HER2 muhtemelen bir reseptör-feedback mekanizma ile baskılanmaktadır.

2. HER2 ekstrasellüler domaininin proteolitik yıkımının blokajı

HER2, bir transmembran proteini olarak fizyolojik proteolize uğrayabilir. Bu proteolitik süreç ekstrasellüler domainin reseptörden ayrılması ve 2 reseptör fragmanının (p105 ve p95) ortaya çıkması ise sonuçlanır. P105 (solubl HER2) ekstrasellüler kompartmana salınır, p95 ise plazma membranında kalır (42). Trunkat (kesik) olarak adlandırılan membrana-bağlı p95 fragmanı artmış tirozin kinaz aktivitesi ve sinyal potansiyeli ile ilişkili gözükmektedir (55). Molina ve arkadaşları HER2 aşırı ekspresyonu olan meme kanseri hücre dizilerinde trastuzumabın metalloproteinaz aktiviteyi inhibe ederek ekstrasellüler domainin ayrılmasını bloke edebildiğini göstermişlerdir (56). Aslında yazarlar inceledikleri 24 meme kanseri dokusu örneğinin 14'ünde fosforillenmiş bir trunkat reseptör saptamışlardır. HER2'nin ekstrasellüler domaini ayrıldığı zaman muhtemelen seruma salınmaktadır. Trastuzumabın tek ajan olarak kullanıldığı bir faz II çalışmada HER2 ekstrasellüler domaini plazma konsantrasyonu 500 ng/ml'den yüksek bulunmasının trastuzumabın azalmış serum yarı ömrü ve subterapötik düzeyleriyle beraber olduğu görülmüştür (57); trastuzumab tedavisi sırasında HER2 ekstrasellüler domaininin serum düzeyinin düştüğü gösterilmiş olmasına karşın son yayınlanan bir metaanalizde ekstrasellüler domaininin trastuzumab yanıtını ve progresyonu predikte etmediği bildirilmiştir (58).

3. p27 düzeylerinin ve p27-CDK2 interaksiyonunun arttırılarak CDK2 aktivitesinin azaltılması

Hücre siklusunda G1-S geçişi siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların inhibitörleri ile kontrol edilmektedir. Tümör hücrelerinin CDK inhibitörlerinin regülasyonunu bozarak hücre siklusunun kontrolünü ortadan kaldırması sık görülen bir

durumdur. p27, CDK inhibitörlerinin Kip/Cip ailesinin bir üyesidir. Aynı zamanda bir tümör baskılayıcı gen olan p27, siklin E-CDK2' yi inhibe ederek G1 arrestine yol açmaktadır. p27 proteinindeki artış proliferen hücreleri hücre siklusundan çıkarmaktadır, buna karşın düşük p27 düzeylerinde veya artmış p27 degradasyonu durumunda siklus dışındaki hücreler tekrar proliferen olmaya başlamaktadır (59). Düşük p27 proteini yüksek gradlı ve agresif seyirli meme, over, mide, kolon, akciğer ve prostat kanserini içeren bir çok tümörle ilişkili bulunmuştur (59).

HER2 sinyali p27' nin regülasyonunda rol oynamaktadır. Öncelikle; HER2 ve p27' nin biyolojik fonksiyonları birbirinden tamamen farklıdır. HER2 en güçlü hücre büyüme stimülatörleri ve onkogenlerinden biridir. p27 ise en etkili büyüme inhibitörlerinden ve tümör baskılayıcılarından biridir. HER2 ekspresyonu fazla olan meme kanseri hücrelerinde p27 proteini düzeyi düşük bulunurken, düşük derecede HER2 eksprese eden tümör hücrelerinde p27 düzeyi yüksek bulunmuştur (60). Bunun nedeni HER2 ve EGFR-1 sinyalinin p27 proteolizini aktive etmesidir. p27 proteolizini aktive eden diğer bir faktör ise bir f-box proteini ve G1-S geçişini düzenleyen moleküllerden biri olan skp-2' nin aktivasyonudur (61). Tüm bunların yanında MAPK p27' yi fosforilleyerek CDK2' ye bağlanmasını azaltmakta, PI3K-bağımlı protein kinaz B aktivasyonu meme kanseri hücrelerinde p27' nin sitoplazmada akümüle olmasına yol açmaktadır (). PTEN ise skp-2' yi baskılayarak p27 yıkımını azaltmaktadır (62).

Trastuzumabın antiproliferatif özellikleri büyük ölçüde p27 proteini üzerindeki etkilerine bağlıdır. Trastuzumab CDK2- aracılı p27 fosforilasyonunu ve ubiquitin-bağımlı degradasyonunu azaltarak p27' nin yarıömrünü uzatmaktadır; ayrıca p27 ile CDK2 komplekslerinin oluşumunu artırıp CDK2 aktivasyonunu azaltarak G1 hücre siklusu arrestine ve S fazına giren hücre sayısının azalmasına yol açmaktadır (63).

4. İntrasellüler sinyal iletiminin inhibisyonu

HER2 aşırı ekspresyonu hücre siklusunu ve apoptozu düzenleyen proteinlerin fonksiyonlarını bozmaktadır. PI3K-Akt ve MAPK, HER2 aşırı ekspresyonu tarafından aktive edildiği en iyi tanımlanmış 2 anahtar sinyal yoludur. MAPK' e bağlı c-myc protoonkogen aktivasyonu p53 ekspresyonunu upregüle etmektedir. Bu transkripsiyon faktörü, CDK inhibitörü p21/WAF1' i düzenleyerek hücre survival'ı ve proliferasyonunda rol oynar. Nükleer p21/WAF1 hücre-siklusu arrestini indükleyerek hücre proliferasyonunu bloke ederken, Akt' la uyarılmış p21/WAF1 sitoplazmaya transloke olmakta ve apoptozu inhibe etmektedir. HER2' ye bağlı PI3K aktivasyonu ise, Akt' ın fosforile ve aktive halde olduğu yer olan plazma membranına translokasyonunu sağlayan fosfoinozitidlerin üretilmesini sağlamaktadır; Akt ise çeşitli hedef molekülleri fosforillemektedir (21).

Trastuzumab HER2 aktivasyonunu/fosforilasyonunu inhibe ederek MAPK ve PI3K-Akt gibi downstream sinyal moleküllerini etkiler, ayrıca bir kinaz düzenleyicisi olan siklin D' yi de baskılar; sonuçta hücre proliferasyonu bloke olur. Trastuzumabla bu 2 sinyal yolunun inhibisyonu sonucu survivin düzeyleri azalır ve apoptoza direnç ortadan kalkar (21). Daha önce bahsedildiği gibi trastuzumab p27 düzeyini arttırarak G1 arrestini arttırır ve S fazına giren hücre sayısını azaltır (63). Son zamanlarda ortaya çıkmış olan bir alternatif mekanizma ise Nagata ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu mekanizmaya göre trastuzumab PTEN' in fosforilasyonunu azaltarak PTEN' in membran lokalizasyonunu, dolayısıyla da aktivitesini arttırmaktadır (24). Daha sonra gelen çalışmalar özellikle düşük PTEN ekspresyonunun kötü prognoz ve trastuzumaba yanıtızlıkla ilişkili olduğunu göstermiştir.

5. İmmun-aracılı yanıt (Antikor-bağımlı hücresele sitotoksisite)

In vitro çalışmaları trastuzumabın HER2 pozitif meme kanseri hücrelerine karşı antikor-bağımlı hücresele sitotoksisiteyi (ABHS) uyardığını, buna karşın HER2' yi yüksek oranda eksprese etmeyen hücrelere karşı böyle bir yanıt oluşturmadığını göstermiştir (64,65). Trastuzumab içeriğinde bir IgG1 Fc (4D5) yapısı içermektedir ve immün efektör hücrelerde (başlıca NK hücre' leri olmak üzere) bulunan Fc reseptörü, hedef hücrelere bağılı antikorun Fc kısmını tanıdığı zaman bu hedef hücrelere karşı immün yanıt oluştururlar. Xenograft modellerde Fc γ reseptörü null sıçanlarda yapılan bir çalışmada trastuzumabın kontrol grubuna göre daha düşük antitümöral etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca yine 4D5 antikorunu ile muamele edilen sıçanlarda ABHS' nin oluşmadığı ve antitümöral yanıtın bununla orantılı şekilde düşük olduğu gözlenmiştir (66). Dahası neoadjuvan trastuzumab uygulanan olgularda operasyon sonrası incelenen tümör örneklerinde trastuzumab uygulanmayanlara göre daha fazla lenfosit (başta NK hücreleri olmak üzere) infiltrasyonu bulunduğu görülmüştür (67). Tüm bu bulgular trastuzumabın ABHS' yi aktive ederek etki ettiği hipotezini desteklemektedir. Trastuzumaba anti-HER2 aşılardan ve aktive CD8 lenfositlerin eklenmesiyle bu immün yanıtın artırılmasına yönelik çalışmalar başlatılmıştır.

Trastuzumabın kompleman-aracılı sitotoksisiteyi de uyardığına dair bulgular mevcuttur. Hayvan modellerinde trastuzumab uygulanması sonrası tümör dokusunda kompleman komponentlerinin akümüle olduğu gösterilmiştir (68). Buna karşın tümör hücreleri membran kompleman düzenleyici protein (mCRP) üretimini artırarak kompleman-aracılı lizisten korunmaktadırlar. Jurianz ve arkadaşlarının çalışmasında mCRP' nin nötralizasyonu ile trastuzumab uygulanan meme kanseri örneklerinde tümör lizisinin arttığı, ancak efektif kompleman-aracılı sitotoksistenin gözlenmediği

bildirilmiştir; araştırmacılar kompleman aktivasyonunun trastuzumabın in vivo antitümöral aktivitesine katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (69).

6. Tümöre bağlı angiogenezin inhibisyonu

Meme kanserinde HER2 ekspresyonu artmış angienezisle yakından ilişkilidir. HER2 pozitif meme kanseri modellerinde trastuzumab tedavisi ile tümör vaskülatüründe regresyon ve normalizasyon izlenmiştir (70). Trastuzumab in vivo olarak mikrodamar yoğunluğunu, in vitro olarak da endotelial hücre migrasyonunu azaltmaktadır. Sonuçta tümör dokusunda damar çapı, damar volümü ve vasküler permeabilite azalmakta, bu da tümör büyüme hızının azalması ve sağkalımın uzaması ile sonuçlanmaktadır (70). Trastuzumab angiogenik faktörlerin (VEGF, TGF α , PAI-1, angiopietin-1) üretimini baskımlarken, anti-angiogenik faktörlerin (trombospondin 1) yapımını da uyardmaktadır (70). Klos ve arkadaşları trastuzumaba kemoterapötik bir ajanın eklenmesiyle antiangiogenik etkinin artırılıp arttırılamayacağını incelemişlerdir (71). Bu hayvan modelli çalışmada tek başına trastuzumab, tek başına paklitaksel ve trastuzumab+paklitaksel uygulamaları karşılaştırılmış, sonuçta en iyi tümör yanıtının trastuzumab+paklitaksel kombinasyonu ile elde edildiği ve tümör yanıtının mikrodamar yoğunluğu ile korele olduğu saptanmıştır. Bu durumun paklitaksel ile trastuzumabın sinerjistik etkisi yanında, trastuzumab-aracılı tümör damarlanmasındaki normalizasyon sonucu kemoterapötik ajanın tümör dokusuna daha iyi ulaşmasının sonucu olduğu düşünülmektedir. Diğer bir anti-VEGF ajan olan bevasizumabla trastuzumabın HER2 pozitif meme kanserinde kombine edilmesini öngören çalışmanın ilk açıklanan sonuçları umut vaat etmektedir (72).

7. DNA hasarının onarımının inhibisyonu

Trastuzumab çeşitli antitümöral ajanlarla sinerjistik ve additif antitümöral etki göstermektedir. Sinerjistik etki gösterdiği ajanlar içerisinde sisplatin, etoposid ve tiotepa;

additif etki gösterdiği ajanlar arasında ise antrasiklin, paklitaksel, metotreksat ve vinblastin yer almaktadır (73). Sinerjistik etkinin trastuzumabın DNA onarımını engellemesine bağlı olduğu düşünülmüştür, çünkü sisplatin, etoposid ve tiotepanın her üçü de DNA hasarı yapmaktadır. Yapılan çalışmalar trastuzumabın sisplatin reaksiyon ürünlerinin onarımını ve DNA sentezini belirgin olarak azalttığını ortaya koymuştur (74). Ayrıca sisplatin tedavisiyle beraber trastuzumab uygulanan tümör hücrelerinde, DNA hasarına hücrel yanıtın önemli bir medyatörü olan p21/WAF1 ekspresyonunun trastuzumabsız tek başına sisplatin uygulanan tümör grubuna kıyasla daha düşük olduğu gösterilmiştir (74). HER2 pozitif meme kanserinde paklitaksel direncinden sorumlu tutulan p21' in trastuzumab tarafından inhibe edilmesi, bu hedefli molekülün paklitakselle beraber kullanıldığında neden daha yüksek etkinlik elde edildiğinin de açıklamalarından biridir (71). Sonuç olarak bulgular trastuzumabın kemoterapiye bağlı DNA hasarının onarımını inhibe ettiğini ve kemoterapinin etkisini arttırdığını göstermektedir.

Benzer bulgular radyasyona bağlı DNA hasarı için de söz konusudur (75). Radyoterapi sonrası DNA onarımı için hücreler G1 veya yavaş S1 fazında siklus arrestine ihtiyaç duyarlar. İntrasellüler sinyalizasyonun azalması sonucu trastuzumab hücrelerin siklus arrestinden erken kaçışını ve DNA hasarının akümülyasyonunu artırır. Kemoterapide olduğu gibi, radyoterapiye cevap olarak da p21/WAF1 düzeyleri artmaktadır. Trastuzumab bu proteinin fosforilasyonunu inhibe ederek kanser hücrelerinin radyasyona bağlı hasara yanıtını baskılayabilir (75). Preklinik bulgular HER2/PI3K-Akt yolunun uyarılmasının da radyasyona bağlı apoptoza dirençte rol oynadığını düşündürmektedir (76).

TRASTUZUMABIN KLİNİKTE KULLANIMI

A-METASTATİK HASTALIK

Trastuzumab'ın metastatik meme kanserinin tedavisinde kullanıldığı ilk faz II çalışma 1996' da yayınlanan Baselga ve arkadaşlarının çalışmasıdır (57). Bu çalışmada daha önce yoğun tedavi almış, HER2 durumu IHC ile 2+ veya 3+ olan metastatik meme kanserli 46 hastaya 250 mg yükleme dozu ve ardından haftada 100 mg olmak üzere 10 haftalık süre boyunca tek ajan olarak trastuzumab uygulanmıştır. Genel yanıt oranı %11.6 (n=5) saptanmış ve 1 hastada tam yanıt elde edilmiştir, tedavi güvenilir bulunmuştur. Cobleigh ve arkadaşlarının daha fazla sayıda hastayı içeren çok merkezli faz II çalışmasında ise daha önce 1 veya 2 kez kemoterapi almış ve progresyonda olan HER2 pozitif (IHC ile 2+ veya 3+) metastatik meme kanserli 222 hasta 4 mg/kg'lık yükleme dozu ve takiben haftada 2 mg/kg olmak üzere tek ajan olarak trastuzumab almışlardır (77). Bu çalışmada da 8 hastada tam yanıt ve 26 hastada parsiyel yanıt olmak üzere objektif yanıt oranı %15 bulunmuştur. Her iki çalışmada da yanıt oranının yüksek olmayışı hastaların daha önce yoğun antitümöral tedavi almış olmaları ve sonradan aydınlatılacağı üzere IHC ile HER2 durumu 2+ olan hastaların da çalışmada bulunmasına bağlanmıştır.

Vogel ve arkadaşları daha önce tedavi almamış HER2 aşırı ekspresyonu olan metastatik meme kanserli 114 hastada tek ajan olarak uygulanan trastuzumabın etkinliğini ve güvenilirliğini araştırmışlardır (78). Daha önceki 2 çalışmadan farklı olarak bu faz II çalışmada ilk basamak tedavide 2 farklı doz rejimi uygulanmış (59 hastaya 4 mg/kg yükleme dozunun ardından haftada 2 mg/kg; 55 hastaya ise 8 mg/kg yükleme dozunun ardından haftada 4 mg/kg) ve HER2 durumu 2+ ve 3+ olan hastalar ayrı ayrı incelenerek bu hastaların yanıt oranları karşılaştırılmıştır; ayrıca retrospektif olarak tümör dokusu gen analizine uygun olan olgularda FISH ile HER2 amplifikasyon

durumu incelenerek FISH pozitif ve negatif olguların yanıt oranları incelenmiştir. Farklı doz uygulanan 2 tedavi grubu arasında yanıt oranı ve sağkalım benzer bulunmuştur. Buna karşın HER2 durumu 3+ olan grupta yanıt oranı %35 iken HER2 durumu 2+ olan grupta yanıt oranı %34 iken FISH (+) olan grupta yanıt oranı %34 iken FISH (-) olan grupta bu oran %7 bulunmuştur. Bu çalışmadan çıkarılan sonuçlara göre trastuzumab dozunu arttırmak etkinliğini arttırmamaktadır; daha sonra Baselga ve arkadaşlarının 8 mg/kg'lık yükleme dozunu takiben 6 mg/kg'lık dozu 3 haftada bir uygulama şeklinde dizayn edilen çalışmasında da diğer haftalık uygulamayı içeren çalışmalarla benzer sonuç alınmıştır (79). Asıl önemli olan nokta HER2 durumunun tedavi yanıtına olan etkisidir. Çalışmada yanıt alınan tüm hastalar HER2 3+ veya FISH(+) olan hastalardır. Daha sonra yapılan bir çalışmada metastatik meme kanserli hastalar tek başına paklitaksel ve paklitaksel+trastuzumab kombinasyonuna randomize edilmiş ve trastuzumabın HER2 durumu 3+ olan hastalarda etkili olduğu gözlenirken HER2 durumu normal olan hastalarda yanıt oranının anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır (80). 2007' de Amerikan Patologlar Birliği yapılan çalışmaların sonuçlarını incelemiş ve tüm bilgiler ışığında en efektif test stratejisinin IHC ile HER2 durumu 2+ saptanan hastalarda FISH ile gen amplifikasyonu incelenmesi olduğunu bildirmiştir (16). Bu şekilde, trastuzumabdan fayda görmesi olası hastaların tedavi edilmeme riski minimize edileceği gibi, trastuzumabdan fayda görmesi ihtimali düşük olan hastaların da gereksiz tedavi alması önlenmiş olacaktır; bu ayırım daha sonra anlatılacak olan adjuvan amaçlı trastuzumab uygulamasında özellikle önem arz etmektedir.

Trastuzumabın kemoterapiyle kombine kullanıldığı faz II çalışmaların ardından ilk faz III çalışma 2001' de Slamon ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (81). Birinci basamak kemoterapiye (antrasiklin temelli veya taksan içeren) trastuzumab eklenmesi hastaliksız sağkalımı (medyan 7.4 aya 4.6 ay, $p < 0.001$), objektif yanıt oranını

(%50' ye %32, $p<0.001$), genel sağkalımı (25.1 aya 20.3 ay, $p<0.01$) uzatmakta ve ölüm riskini %20 azaltmaktadır. Ancak antrasiklin temelli tedaviye trastuzumab eklenmesi ile kardiyak disfonksiyon riski belirgin olarak artmaktadır. Marty ve arkadaşlarının çalışmasında birinci basamakta dosetaksele eklenen trastuzumab ile tek başına dosetaksel ile karşılaştırıldığında yanıt oranı (%61' e %34, $p=0.0002$), progresyona kadar olan süre (11.7 aya 6.1 ay, $p=0.0001$) ve genel sağkalım (31.2 aya 22.7 ay, $p=0.0325$) açısından belirgin iyileşme olduğu görülmüştür (82). Çalışmada dosetaksele trastuzumab eklenmesiyle kardiyak disfonksiyon riskinde artış görülmemesi bu iki ajanın beraber kullanılmasının etkin ve güvenilir olduğunu konfirme etmiştir. HERTAX çalışmasında ise birinci basamakta trastuzumab monoterapisi ile başlanıp progresyon geliştiğinde dosetakselle devam edilmesi, trastuzumab+dosetaksel kombinasyonu ile başlanıp devam edilmesi ile karşılaştırıldığında progresyonsuz sağkalım açısından eşdeğer, grad 3-4 yan etki açısından ise üstün bulunmuştur (83). İki faz II çalışmada trastuzumabın haftalık veya 3 haftalık paklitaksel kombinasyonunun etkin ve güvenilir olduğu gösterilmiştir (84,85). Trastuzumab+paklitaksel kombinasyonuna karboplatin eklenmesi yanıt oranını arttırmakta, progresyonsuz sağkalımı uzatmaktadır (86), ancak BCIRG 007 çalışmasında trastuzumab+dosetaksel kombinasyonuna karboplatin eklenmesinin yanıt oranını, progresyonsuz sağkalımı ve genel sağkalımı değiştirmedeği görülmüştür (87).

Prelinik ve klinik bilgiler HER2 pozitif/HR pozitif meme kanserli hastaların HER2 negatif/HR pozitif hastalara kıyasla hormonoterapiden daha az fayda gördüğünü göstermektedir (88,89). Trastuzumabın tamoksifen veya fluvestrantla beraber kullanıldığında hormonal tedaviye direncin ortadan kalktığının ve tümör büyümesinin inhibe olduğunun gösterilmesi, bu hastalarda HER2 ve ER yollarının her ikisinin de bloke edilmesinin tek başına hormonoterapiye göre daha fazla fayda sağlayabileceğini

düşündürmüştür (90,91). Bu amaçla düzenlenen bir faz III çalışma olan TAnDEM çalışmasında 103 postmenapozal HER2 pozitif/HR pozitif metastatik meme kanserli hastada anastrozol+trastuzumab kombinasyonu ile tek başına anastrozol karşılaştırılmıştır (92). Kombinasyon kolunda progresyonsuz sağkalım tek başına anastrozole göre daha uzun bulunmuştur (4.8 aya 2.4 ay, $p=0.0016$). Genel sağkalım açısından 2 grup arasında fark saptanmamıştır (28.5 aya 23.9 ay, $p=0.325$), ancak tek başına anastrozol kolundaki hastaların %70' inin progresyon geliştiği zaman trastuzumab+anastrozol koluna geçtiği belirtilmiştir. Trastuzumabın letrozolle kombine kullanıldığı bir faz II çalışmada ise yanıt oranı %26, klinik yarar oranı ise %52, progresyona kadar geçen süre 5.8 ay, medyan yanıt süresi ise 20.6 ay olarak bulunmuştur (93). Sonuçlar HER2 pozitif/HR pozitif meme kanserinin heterojen bir hastalık olduğunu işaret etmektedir.

B- ERKEN EVRE HASTALIK

Trastuzumabın metastatik meme kanserinde sağkalım avantajı sağladığının gösterilmesi üzerine erken evre meme kanserinin adjuvan tedavisinde kullanımını değerlendiren klinik araştırmalar başlatılmıştır. Literatürde adjuvan tedavide trastuzumabın etkinliğinin değerlendirildiği 4 büyük ve 1 küçük prospektif randomize çalışma yayınlanmıştır. Bunlar National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-31, North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) N9831, HERceptin Adjuvant (HERA), Breast Cancer International Research Group (BCIRG) 006 ve Finland Herceptin (FinHer) çalışmalarıdır.

NSABP B-31 çalışmasında HER2 pozitif, nod pozitif hastalar 2 gruba randomize edilmişlerdir; 3 haftada bir uygulanmak üzere dört siklus doksorubisin ve siklofosfamid, ardından 3 haftada bir 4 siklus paklitaksel (grup 1) ve aynı kemoterapi rejimine paklitakselin ilk uygulandığı günden başlamak üzere 52 hafta süreyle eklenen

trastuzumab (grup 2). NCCTG N9831 çalışmasında ise HER2 pozitif, nod pozitif ya da nod negatif, tümör çapı >1 cm ve ER/PR negatif veya tümör çapı >2 cm ve ER negatif/PR pozitif meme kanserli hastalarda 3 tedavi rejimi karşılaştırılmıştır; 4 siklus doksorubisin ve siklofosfamid, ardından 12 hafta süreyle uygulanan haftalık paklitaksel (grup A), aynı kemoterapi rejimine eklenen ve paklitaksel tedavisi tamamlandıktan sonra başlanan 52 hafta süreyle trastuzumab (grup B), aynı kemoterapi rejimine eklenen ve paklitakselin ilk uygulandığı günde başlanan 52 hafta süreyle trastuzumab (grup C). Uygulanan trastuzumab dozu 4 mg/kg'lık yüklemeyi takiben haftalık olarak 2 mg/kg'dır. Her iki çalışmada da endikasyonu olan vakalara radyoterapi ve hormonal tedavi uygulanmıştır. Hasta gruplarının ve tedavi rejimlerinin benzerliğinden dolayı iki çalışmanın ilk interim analizi birleştirilmiş ve 2005'te yayınlanmıştır (94). Ortalama 2 yıllık izlem sonunda 52 haftalık trastuzumab tedavisi alan hastalarda hastalıksız sağkalımda %52'lik iyileşme (HR: 0.48; 95% CI, 0.39-0.59; p<0.0001) ve ölüm riskinde %33'lük azalma (HR: 0.67; 95% CI, 0.48-0.93; p<0.015) saptanmıştır. Bu interim analizin güncellenen ve 3969 hastayı içeren 4 yıllık izlem sonuçlarında rekürrens riskinde %52'lik azalma (HR: 0.48; %95 CI, 0.41-0.57; p<0.0001) ve ölüm riskinde %35'lik azalma (HR: 0.65; %95 CI, 0.51-0.84; p=0.0007) bildirilmiştir (95).

HERA çalışmasında ise HER2 pozitif, lokorejyonel tedavisi ve en az 4 siklus neoadjuvan veya adjuvan kemoterapisi tamamlanmış, nod pozitif veya nod negatif ve tümör çapı ≥ 1 cm olan meme kanserli hastalar 3 gruba randomize edilmişlerdir; 2 yıl süreyle trastuzumab (grup 1, n=1694), 1 yıl süreyle trastuzumab (grup 2, n=1694) ve tedavisiz gözlem (grup 3, n=1693) (96). Uygulanan trastuzumab dozu 8 mg/kg'lık yüklemeyi takiben 3 haftada bir 6 mg/kg'dır. Medyan 1 yıllık izlemde sadece 1 yıl süreyle trastuzumab uygulanan ve tedavisiz takip edilen hastalar birbiriyle karşılaştırıldığında trastuzumab kolunda hastalıksız sağkalımda %46'lik iyileşme (HR:

0.54; %95 CI, 0.43-0.67; $p<0.0001$) ve 2 yılda %8.4' lük mutlak yarar sağlandığı bildirilmiştir, genel sağkalım açısından 2 grup arasında fark bulunmamıştır. Çalışmanın 2 yıllık izlem sonunda güncellenen incelemesinde ise hastalıksız sağkalımdaki iyileşmenin devam ettiği (HR: 0.64, %95 CI, 0.54-0.76; $p<0.0001$), ayrıca genel sağkalımda da iyileşme olduğu gözlenmiştir (HR: 0.66; 95% CI, 0.47-0.91; $p=0.0115$) (97).

BCIRG 006 çalışmasında HER2 pozitif, nod pozitif veya yüksek riskli nod negatif 3222 hasta 3 tedavi grubuna randomize edilmiştir (98). Trastuzumab içermeyen kolda doksorubisin ve siklofosfamid, ardından dosetaksel (AC→T) uygulanmıştır. İkinci grupta aynı kemoterapi rejimine ek olarak 1 yıl süreyle trastuzumab kullanılmıştır (AC→TH), trastuzumab dosetakselin ilk dozu ile başlanmıştır. Üçüncü grupta ise karboplatin, dosetaksel ve trastuzumab kullanılmıştır (TCH), trastuzumab yine 1 yıl süreyle uygulanmıştır. Üç yıllık izlemde AC→TH alan hastalar trastuzumabsız tedavi (AC→T) alanlarla kıyaslandığında, trastuzumab eklenmesi ile hastalıksız sağkalımda %39' luk iyileşme sağlandığı görülmüştür (HR: 0.61; %95 CI, 0.48-0.76; $p<0.0001$). Benzer şekilde TCH grubundaki hastalarda da sadece kemoterapi alan (AC→T) gruba kıyasla hastalıksız sağkalımda %33' lük iyileşme saptanmıştır (HR: 0.67; %95 CI, 0.54-0.83; $p=0.0003$). İki trastuzumab içeren rejim arasında hastalıksız sağkalım açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Her iki trastuzumab içeren rejimin de AC→T grubuna kıyasla genel sağkalım avantajı sağladığı gösterilmiştir [(AC→TH için HR: 0.59; %95 CI, 0.42-0.85; $p=0.004$), (TCH için HR: 0.66; %95 CI, 0.47-0.93; $p=0.017$)]. Antrasiklinsiz ve trastuzumab içeren bir rejim olan TCH' in etkinliği antrasiklinli rejimle eşdeğer görünmektedir ve kardiyak disfonksiyon sıklığı TCH ile daha düşüktür; bu nedenle TCH adjuvan tedavide bir seçenektir.

Adjuvan trastuzumab çalışmaları içerisinde en kk hasta grubuna sahip olan FinHer çalışmasında 1010 meme kanserli hasta 9 hafta vinorelbini takiben 3 siklus FEC ve 9 hafta dosetakseli takiben 3 siklus FEC kemoterapisine randomize edilmiştir (99). Bu hasta grubu içerisinde HER2 pozitif, nod pozitif ya da nod negatif ve tümör çapı ≥ 2 cm, progesteron reseptörü negatif olan 232 hasta, başlangıçtaki 9 haftalık vinorelbin veya dosetaksel kemoterapisine trastuzumab eklenenler ve eklenmeyenler olmak üzere 2 gruba randomize edilmişlerdir. Medyan 3 yıllık izlemde trastuzumab eklenen grupta rekürrens riskinde anlamlı azalma saptanmıştır (HR: 0.42, %95 CI, 0.21-0.83; p=0.01), anlamlı sağkalım yararı ise gösterilememiştir (HR: 0.41, %95 CI, 0.16-1.08; p=0.07). Beş yıllık izlem sonuçları açıklandığında dosetaksel alan hastalarda vinorelbin alanlara göre uzak hastalıksız sağkalımın daha iyi olduğu görülmüştür (HR: 0.66; %95 CI, 0.49-0.91, p=0.01) (100). Trastuzumab alan hastalarda almayanlara göre uzak hastalıksız sağkalım istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha iyi görünmektedir (HR: 0.65; %95 CI, 0.38-1.12, p=0.12), ancak nod pozitif hastalarda HR anlamlı bulunmuştur (HR: 0.57, p=0.047). Dosetakselle trastuzumab eklenmesi vinorelbine eklenmesiyle karşılaştırıldığında uzak hastalıksız sağkalımı daha olumlu yönde etkilemektedir (HR: 0.31, p=0.02).

Tüm adjuvan trastuzumab çalışmalarında kemoterapiye trastuzumab eklenmesi ile hastalıksız sağkalımda ve genel sağkalımda iyileşme yönünde sonuçlar alındığı gözlenmiştir. Sağlanan yarar ER durumundan bağımsızdır. Bu sonuçlar doğrultusunda bugün için HER2 pozitif ve >1 cm tümörü olan tüm erken evre meme kanserli hastalara adjuvan tedavide trastuzumab içeren bir kemoterapi rejimi uygulanması kategori 1 öneri olarak NCCN kılavuzuna girmiştir.

Trastuzumab tek başına kullanıldığında miyelosupresyon, bulantı ve kusma çok nadirdir, alopesi bildirilmemiştir. İnfüzyonla ilişkili ateş ve titreme gibi semptomlar ve

hipersensivite benzeri reaksiyonlar genellikle hafiftir ve standart antihistaminik ve antiinflamatuvar tedaviye yanıt verir (101).

Trastuzumabla ilişkili kardiyak disfonksiyona dair ilk bilgiler metastatik meme kanserli hastalarda yapılan çalışmalardan gelmiştir. Slamon ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen trastuzumabın kemoterapiyle beraber kullanıldığı ilk faz III çalışmada asemptomatik veya semptomatik kardiyak disfonksiyon sırasıyla AC+trastuzumab alan hastaların %27' sinde, sadece AC alan hastaların %8' inde, paklitaksel+trastuzumab alan hastaların %13' ünde ve sadece paklitaksel alan hastaların %1' inde görülmüştür (81). New York Heart Association kriterlerine göre klas III veya IV konjestif kalp yetersizliği (KKY) en yüksek oranda AC+trastuzumab alan hastalarda saptanmıştır (%16), buna karşın sadece AC alanlarda %3, paklitaksel+trastuzumab alanlarda %2 ve sadece paklitaksel alanlarda %1 oranında bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları kendisinden sonra gelen diğer çalışmaların dizaynını da etkilemiş ve hiçbir çalışmada antrasiklin içeren rejimlerle eş zamanlı trastuzumab kullanılmamıştır. Özellikle adjuvan çalışmalarda düzenli kardiyak monitorizasyon ve trastuzumab alması planlanan hastalar için kardiyak fonksiyonlara yönelik kriterler konmuştur.

NSABP B-31 çalışmasında hastaların %14' ünde (102), NCCTG N9831 çalışmasında %8-10' unda (103), HERA çalışmasında ise %3' ünde (97) ejeksiyon fraksiyonundaki (EF) düşüş meydana gelmiştir. NSABP çalışmasında 5 yıllık izlemde trastuzumab alan hastaların %3.9' unda, kontrol grubundaki hastaların ise %1.3' ünde klas III-IV KKY ve kardiyak ölüm ortaya çıkmıştır (104). NCCTG N9831 çalışmasında ise 3 yıllık izlemde bu oranlar sırasıyla AC' yi takiben paklitakselle beraber trastuzumab alan hastalarda %2.5, trastuzumabsız rejim alanlarda ise %0.2' dir (103). HERA çalışmasında semptomatik KKY oranı trastuzumab alan hastalarda %2, kontrol grubunda %0.2' dir (105). BCIRG çalışmasında ise klas III-IV KKY insidensi kontrol

grubunda (AC→T) %0.38, AC→TH grubunda %1.9, TCH grubunda ise %0.4 olarak bulunmuştur (98). TCH rejimi ile KKY riski antrasiklin içeren rejimlere göre daha düşüktür. Trastuzumab tedavisi sırasında KKY sıklığı EF %50-54 olanlarda EF %55' in üzerinde olanlarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Trastuzumab-ilişkili kardiyak disfonksiyonun antrasiklin-ilişkili kardiyak disfonksiyondan en önemli farkı doza bağımlı olmaması, kolaylıkla tedavi edilebilir olması ve sonuçta kardiomyositlerde önemli bir kalıcı morfolojik hasara yol açmamasıdır (106). Son zamanlarda yayınlanan iki metaanalizde adjuvan trastuzumab tedavisinin risk/yarar oranının olumlu olduğu bildirilmiştir (107,108). Olguların çoğunda kardiyak disfonksiyon medikal tedaviyle hızla düzelir. Buna karşın bazen EF' ndeki düşüklük aylarca devam edebilir. Bu hastalarda medikal tedaviye devam edilmeli ve dikkatli kardiyak monitorizasyon yapılmalıdır, uzun vadede bu durumun prognoza etkisi olmadığı bildirilmiştir (109).

TRASTUZUMAB DİRENCİ

Tek ajan olarak trastuzumab alan metastatik meme kanserli hastaların %66-88' inde tedaviye cevap alınamamaktadır. Ayrıca hastaların çoğunda başlangıçta trastuzumaba cevap olsa dahi genellikle ilk bir yıl içinde direnç gelişmektedir. Adjuvan trastuzumab alan hastaların ise yaklaşık %15' inde tedaviye rağmen metastatik hastalık ortaya çıkmaktadır (48). Primer ve sekonder (kazanılmış) trastuzumab direncinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması HER2 pozitif metastatik meme kanserli hastaların prognozunu düzeltmek adına önem taşımaktadır. Trastuzumab direncinden sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalar tablo 4' te belirtilmiştir.

1. Reseptör-antikor etkileşiminin değişimi

a. p95HER2 (trunkat HER2)

Daha önce bahsedildiği üzere trastuzumab HER2' nin ekstrasellüler domainine bağlanarak etki göstermektedir. p95HER2 olarak da adlandırılan HER2' nin trunkat (kesik) formu reseptörün amino terminal kısmı kesik olan karboksi terminal fragmanlarından oluşur. p95HER2 sürekli tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve trastuzumabın bağlanabilmesi için gerekli ekstrasellüler bölgenin yokluğu ile karakterizedir (56). Bu fragmanlar HER2' nin ekstrasellüler domaininin proteolitik ayrılması sonucu ya da transmembran domaininin öncesinde ve sonrasında yer alan 2 metionin rezidüsünün (611 ve 687. pozisyonda) translasyonunun başlaması ile meydana gelirler. Trastuzumab HER2' nin ekstrasellüler domaininin ayrılmasını ve sonuçta p95HER2 oluşumunu bloke etmektedir. Deneysel olarak p95HER2 aşırı ekspresyonu olan HER2 pozitif meme tümörlerinin trastuzumaba dirençli olduğu gösterilmiştir (25). Aynı çalışmanın 46 metastatik meme kanserli hastayı içeren klinik kolunda ise 9 hastanın (%20) p95HER2 eksprese ettiği saptanmıştır. Bu 9 hastanın sadece 1' inde (%11.1) trastuzumaba yanıt alınırken, HER2' yi tam molekül haliyle eksprese eden 37 hastanın 19' unda (%51.4) trastuzumaba yanıt alınmıştır. Son zamanlarda yayınlanan ve 93 metastatik meme kanserli hastayı içeren bir retrospektif çalışmada da p95HER2 eksprese eden hastalarda progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım HER2' yi tam molekül haliyle eksprese eden hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha kısa bulunmuştur (110).

Lapatinib hem EGFR hem HER2' yi inhibe eden dual etkili bir TKI' dür. Scaltriti ve arkadaşlarının çalışmasında p95HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde lapatinib tedavisi ile p95 fosforilasyonunun ve Akt' ın downstream fosforilasyonunun dolayısıyla da tümör büyümesinin inhibe olduğu gösterilmiştir, buna karşın aynı

hücrelerde trastuzumabın etkili olmadığı gözlenmiştir (25). Bu prelinik veriler temelinde düzenlenen bir faz III çalışmada ise antrasiklin, taksan ve trastuzumab içeren tedaviler almış ve progresyonda olan metastatik meme kanserli hastalarda kapesitabine eklenen lapatinib ile sadece kapesitabin karşılaştırılmış ve lapatinibin progresyona kadar olan süreyi uzattığı görülmüştür (22). Bu çalışmadan sonra trastuzumab altında progresyon gösteren hastalarda lapatinibin trastuzumabla kombine kullanımının tek başına lapatinib kullanımıyla karşılaştırıldığında progresyonsuz sağkalımı uzattığını gösteren bir faz III çalışma daha yayınlanmıştır (111).

Tablo 4 – Trastuzumab direncinin mekanizmaları

<p>1. Reseptör-antikor etkileşiminin değişimi</p> <ul style="list-style-type: none"> a. P95HER2 (trunkat HER2) b. Müsin 4 (MUC4) c. CD44/hyaluronan polimer kompleksi <p>2. HER2 downstream sinyal yollarının aktivasyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> a. PTEN b. PI3K c. Akt <p>3. HER2 dışındaki reseptör yollarıyla sinyal iletimi</p> <ul style="list-style-type: none"> a. EGFR ve HER3 b. TGF-α c. p27 d. IGF-1R e. C-Met f. Diğer <p>4. ABHS' nin gerçekleştirilememesi</p>
--

b. Müsin 4 (MUC4)

Müsin 4 (MUC4), N-glikolize bir transmembran alt ünitesiyle (ASGP-2 ya da MUC4 β) buna nonkovalen olarak bağlı bir periferik O-glikolize musin alt ünitesinden (ASGP-1 ya da MUC4 α) oluşan, heterodimerik yapıda, membran-ilişkili bir glikoprotein kompleksidir. MUC4 solunum yolu, kolon, kornea, kadın genital sistemi ve meme gibi vulnerabl dokularda eksprese edilmektedir ve bu epitelyal hücreleri koruyucu rol oynadığı düşünülmüştür (112). Bununla beraber Carraway ve arkadaşları MUC4' ün meme kanserinde tümör progresyonunu uyardığını ileri sürmüşlerdir (113).

MUC4' ün trastuzumab direncine nasıl neden olduğuyla ilgili 2 hipotez vardır. İlki; MUC4' ün HER2 tirozin kinaz aktivitesini arttırmasıdır. Çalışmalarda MUC4' ün ASGP-2 alt ünitesinin adeta bir HER2 ligandı gibi davranarak, HER2' nin EGF-benzeri domainleriyle etkileşime girdiği, böylece reseptörün tirozin rezidülerinin fosforilasyonunu ve dolayısıyla tirozin kinaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (113-115).

Diğer hipotez ise HER2' nin MUC4 tarafından maskelenmesi sonucu trastuzumabın reseptöre bağlanmasının engellenmesidir. Price-Scihavi ve arkadaşları MUC4 aşırı ekspresyonunun erbB2 ekspresyonunu etkilemediğini, buna karşın trastuzumabın erbB2 reseptörüne bağlanmasını azalttığını göstermişlerdir (112); bunun MUC4' ün erbB2 reseptörü ile kompleks oluşturması, bir başka deyişle MUC4' ün erbB2 reseptör yapısını maskeleyerek antikorun reseptöre bağlanmasını engellemesi sonucu meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir. AntiMUC4 antikoruları ile MUC4 blokajı yapıldığında trastuzumabın reseptöre bağlanmasının arttığının gösterilmesi bu hipotezi desteklemiştir.

Nagy ve arkadaşları ise HER2 pozitif meme kanseri hücre dizilerini trastuzumabın reseptöre bağlanması açısından karşılaştırmışlardır (116). Trastuzumaba-dirençli

hücrelerle (JIMT-1) trastuzumaba-duyarlı hücreler arasında trastuzumaba-bağlı erbB2 reseptör internalizasyonu düzeyi açısından fark bulunmamıştır. Buna karşın JIMT-1 hücre dizilerinde trastuzumab epitopunun maskelendiği saptanmıştır ve yazarlar bu maskelenmeden MUC4' ün sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu hipotezi test etmek için hücre dizilerinde MUC4 ekspresyon düzeyini incelemişlerdir. Trastuzumaba-dirençli JIMT-1 hücre dizilerinde MUC4 ekspresyonu trastuzumaba-duyarlı hücre dizilerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur; ayrıca MUC4 yoğunluğu ile trastuzumabın reseptöre bağlanma düzeyi arasında ters korelasyon olduğu görülmüştür. Dahası RNA interferansı ile MUC4 baskılandığında trastuzumab duyarlılığının arttığı gösterilmiştir. İlginç bir nokta, bu maskelenme sonucu HER2' nin sadece trastuzumabla değil, diğer EGFR ailesi üyeleriyle (EGFR ve HER3) de etkileşime girme yeteneğinin azalmasıdır.

c. CD44/hyaluronan polimer kompleksi

CD44 hücreler arası ve hücrelerle ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimde rol oynayan çok-fonksiyonlu bir transmembran reseptörü ve hücre yüzey adezyon molekülüdür. Hücre trafiği, hücrelere kemokin ve büyüme faktörü sunumu, büyüme faktörlerinin aktarımı, apoptoza ve hematopoeze aracılık eden sinyallerin geçişi gibi bir çok süreçte yer aldığı gösterilmiştir (117). Ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşeni olan hyaluronan CD44' ün başlıca ligandıdır. Gastrointestinal tümörler, non-hodgkin lenfoma, mesane kanseri, glioma, serviks kanseri ve meme kanseri gibi bir çok tümörde CD44 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (117).

Hyaluronan' ın, CD44 ekspresyonu olan meme kanseri hücrelerinde malign hücre adezyonu, migrasyonu ve invazyonunu sağladığı düşünülmüştür. Anti-CD44 antikorları kullanılarak yapılan çalışmalarda hücre motilite ve invazyonunun inhibe olduğunun gösterilmesi bu görüşü desteklemektedir (118) . Lopez ve arkadaşları meme kanseri

progresyonu sırasında gelişen metastatik invazyondan CD44' ün sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (119) Bir başka çalışmada ise sürekli erbB2 otofosforilasyonu olan meme kanseri hücrelerinin endojen hyaluronan-CD44 etkileşimine bağımlı olduğu gösterilmiştir (120). Palyi-Krekk ve arkadaşları MUC4' e benzer şekilde CD44-hyaluronan kompleksinin HER2' yi maskeleyerek trastuzumaba direnç oluşturduğu hipotezini ortaya atmışlardır (121). Gerçekten de, JIMT-1 hücrelerinde CD44 aşırı ekspresyonu in vivo erbB2 baskılanması ile korele bulunmuştur; dahası hyaluronan sentezi inhibe edildiğinde trastuzumabın in vivo ve in vitro erbB2' ya bağlanma oranı ve antitümöral etkinliği artmaktadır (121)

2. HER2 downstream sinyal yollarının aktivasyonu

a. PTEN

PTEN, PI3K/Akt sinyal yolunun aktivasyonunu sınırlayan en önemli tümör baskılayıcı genidir. PTEN, PI3K' ı inhibe ederek Akt' ın hücre membranına bağlanması için bir bölge olan PI3P' ın D3 pozisyonunu defosforile etmekte, böylece Akt aktivitesini inhibe ederek antitümöral etki sağlamaktadır. Ayrıca PTEN, hücre büyümesi, proliferasyon ve apoptozda yer alan sinyal ileti yolunda rol oynamakta, siklin D'yi azaltarak ve p27' yi arttırarak hücre siklusunu kontrol etmektedir (24).

Over, endometrium, akciğer, prostat, kolon ve beyin tümörlerinde PTEN kaybı ve PTEN mutasyonları bildirilmekle beraber meme kanseriyle olan ilişkisine dair ilk yayınlar otozomal dominant geçişli meme kanseri sendromları olan Cowden sendromu ve Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromlarında germline PTEN mutasyonlarının bildirilmesiyle olmuştur (122,123). Chen ve arkadaşları inaktive edici PTEN mutasyonlarının herediter meme kanserinde sık, sporadik meme kanserinde ise çok nadir görüldüğünü öne sürmüşlerdir (124). Gerçekten de yapılan çalışmalarda sporadik meme kanserli hastalarda PTEN mutasyonları %1-5 oranında saptanmıştır (124,125).

PTEN kaybı oranı ise %16-48 arasında bildirilmiştir (32,126-128). PTEN mutasyonları ve delesyonları, heterozigotluk kaybı, PTEN haploeksikliği ve epigenetik PTEN downmodulasyonu fonksiyonel PTEN kaybına yol açtığı öne sürülen mekanizmalardır (129). Klinik araştırmalarda PTEN kaybı ile tümör çapı, lenf bezi metastazı, düşük erbB2 ekspresyonu, HR durumu, hormonal tedaviye direnç, kısalmış hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım arasında korelasyon bulunduğu bildirilmiştir, ancak çalışmaların sonuçları çelişkilidir (32,126-136).

PTEN ile erbB2 ve trastuzumab arasındaki ilişkiye dair en önemli kanıtlar, Nagata ve arkadaşlarının 2004' de yayınladıkları çalışmalarıyla elde edilmiştir (24). Bu çalışmada deneysel olarak erbB2 pozitif meme kanseri oluşturulmuş farelerde trastuzumabın erken dönemde PTEN aktivasyonuna yol açtığı, bunun sonucunda PI3K' in inhibe olduğu ve bu inhibisyonun erbB2 baskılanmasından bağımsız geliştiği gösterilmiştir. Trastuzumab reseptöre bağlandığında src' nin erbB2 reseptöründen ayrılmasını sağlayarak, PTEN' in sitoplazmadan hücre membranına, yani aktif olduğu lokalizasyona kaymasına yol açmaktadır; böylece aktive PTEN PI3K sinyal yolunu inhibe edebilmektedir. Dahası; çalışmada PTEN kaybı oluşturulmuş deney farelerinde trastuzumab tedavisine direnç geliştiği, ayrıca bu direncin kemoterapi ajanına değil trastuzumaba spesifik olduğu görülmüştür. Bu deneysel çalışmanın az sayıda hasta içeren kohort kolunda ise, PTEN kaybı olan hastalarda trastuzumab içeren tedaviye yanıtın PTEN pozitif olanlara göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmanın ardından gelen bir başka çalışmada da yine PTEN negatifliği oluşturulmuş meme kanserli farelerde PTEN intakt olanlara göre trastuzumab cevabının daha düşük olduğu ve PTEN negatif farelerde PI3K/akt yolunun PTEN pozitif olanlara göre daha aktif olduğu gösterilmiştir (137). Çalışmanın HER2 pozitif 17 meme kanserli ve 20 kontrolden oluşan klinik kolunda ise PTEN negatiflerde trastuzumab yanıtının

anlamli olarak daha düşük olduğunu ve bu durumun kemoterapötik ajandan bağımsız, trastuzumaba spesifik olduğunu göstermişlerdir. PTEN kaybının trastuzumaba düşük klinik yanıtla ilişkili olduğuna dair kanıtlar bulunmasına karşın, son zamanlarda yapılan bazı klinik çalışmaların sonuçları bu hipotezi desteklememiştir (132,133,135, 136).

b. PI3K

PI3K aktive edici mutasyonlar birçok tümör tipinde bulunmaktadır. Yapılan retrospektif çalışmalarda meme kanserinde sıklığı %18-40 oranında bildirilmiştir (138-40). En sık görülen mutasyonlar ekson 9 ve 20' de görülen nokta mutasyonlardır. Ekson 9 mutasyonu (E542K ve E545G) p110 α ' nın helikal domaininde yer alır ve p85 ile p110 arasındaki inhibitör moleküler etkileşimi ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Ekson 20 mutasyonu (H1047R) ise aktivasyon loop'unun yanında yer alır ve sürekli kinaz aktivitesine yol açmaktadır (141). PI3K mutasyonları normal meme epitelinin malign transformasyonunda rol oynamaktadır ve genellikle karsinogenezin erken dönemlerinde gelişmektedir (142). Deneysel modellerde PI3K aktive edici mutasyonların artmış kinaz aktivitesi, hücre proliferasyonu, metastatik kapasite ve kemoterapiye dirençle birlikte olduğu gösterilmiştir (131). Çeşitli klinik çalışmalarda PI3K mutasyonlarının HR pozitifliği, lenf bezi metastazı ve erbB2 ekspresyonuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir, buna karşın PTEN ekspresyonu ve sağkalım durumuyla ilişkisi net değildir (131,132,134,135, 138,139).

PTEN statusu ile PI3K mutasyonları arasındaki ilişkinin incelendiği birkaç klinik çalışmada PTEN kaybı ile PI3K mutasyonlarının genellikle benzer prognostik faktörlerle ilişkili olduğu ve aynı hastada iki durumun beraber bulunmasının nadiren görüldüğu bildirilmiştir (32,126). Berns ve arkadaşları, HER2 pozitif meme kanserli 55 hastayı içeren çalışmalarında PI3K mutasyonları ve PTEN kaybının kötü prognostik parametreler olduğunu ve hastalıksız sağkalımda azalma ile ilişkili olduğunu

bildirmişlerdir (131); aynı çalışmada PI3K mutasyonları ve PTEN kaybının birlikte değerlendirildiğinde, trastuzumaba düşük yanıtı predikte ettiğini belirtmişlerdir. Bugün için PI3K özellikle HER2 pozitif meme kanseri için önemli bir hedef molekül olarak görülmektedir ve PI3K inhibitörleriyle yapılan çalışmalar umut vaatmektedir.

c. Akt

Akt mutasyonları meme kanserinde %1-8 oranında görülmektedir. Aktive edici mutasyon plekstrin homoloji domaininde (E17K) görülmektedir ve PI3K mutasyonları gibi karsinogenezin erken dönemlerinde geliştiği düşünülmektedir (142), ancak HER2 pozitif meme kanserinde bu mutasyon henüz gösterilememiştir (143). PI3K mutasyonu bulunan HER2 pozitif meme kanserinde hücre büyümesinin downstream Akt aktivitesine bağımlı olduğu, Akt inhibitörleri kullanıldığında ise tümöral büyümenin engellendiği gösterilmiştir (144). Kültür ortamında geliştirilen trastuzumaba-dirençli meme kanseri hücrelerinde Akt ve Akt kinaz aktivitesinin trastuzumaba duyarlı hücrelere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (145). Son zamanlarda yayınlanan iki çalışmada immunhistokimyasal olarak değerlendirilen Akt ekspresyonunun trastuzumaba yanıtla ilişkili olmadığı bildirilmesine karşın (133,136), Fabi ve arkadaşları PTEN ile beraber Akt ekspresyonunun trastuzumabdan fayda görecekten hastaları belirlemede kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (134).

3. HER2 dışındaki reseptör yollarıyla sinyal iletimi

a. EGFR ve HER3

Daha önce de anlatıldığı gibi trastuzumabla HER2 homodimerizasyonu engellenebilmesine karşın, HER2 diğer HER ailesi üyeleriyle heterodimerizasyon oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Trastuzumaba dirençli meme kanseri hücrelerinde EGFR-HER2 heterodimerizasyonunun upregüle olduğu gösterilmiştir (146). Narayan ve arkadaşları uzun süreli trastuzumaba maruz bırakılan meme kanseri hücrelerinde EGFR

ve HER3 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (147). İlginç olan nokta her 2 çalışmada da trastuzumaba dirençli hücrelerin TKI'lerine iyi yanıt vermesidir; bu durum trastuzumab kullanımının TKI'lerine de novo sensitiviteyi arttırdığı yönünde yorumlanmıştır. Bu noktadan yola çıkılarak düzenlenen çalışmalarda trastuzumaba eklenen gefitinible tek başına trastuzumaba göre anlamlı klinik fayda sağlanamamasına karşın (148), trastuzumab altında progresyon gösteren hastalarda lapatinibin anlamlı klinik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (22); ancak bu faydanın lapatinibin potent tirozin kinaz inhibisyonu etkisinden kaynaklanması da muhtemeldir.

Son çalışmalar HER2-HER3 heterodimerizasyonunun HER2 pozitif meme kanserinde hücre büyümesini indükleyen en önemli ve potent uyarıcı olduğunu göstermektedir (149,150). Öyle ki HER3'ün veya HER2-HER3 heterodimerizasyonunun bloke edilmesinin HER2 blokajından daha etkili klinik fayda sağlayabileceği öne sürülmüştür (149). Pertuzumab HER2'nin diğer HER ailesi üyeleriyle heterodimerizasyonunu bloke eden bir monoklonal antikordur. Preklinik çalışmalarda pertuzumabın trastuzumabla kombine kullanıldığında tek başına trastuzumab kullanımına göre daha yüksek antitümör aktivite sağladığı görülmüştür; bu etki trastuzumab altında progresyon gösteren hücrelerde de görülmektedir (150,151). Bu veriler ışığında kemoterapi+trastuzumaba eklenen pertuzumabın etkinliğinin araştırıldığı bir faz III çalışma başlatılmıştır (152).

b. TGF- α

HER2'nin diğer HER ailesi üyelerinin aksine doğal bir ligandı bulunmamaktadır. Diğer reseptörler için mevcut ligandların fazla bulunması halinde heterodimerizasyonun artması sonucu trastuzumabın etkinliği inhibe olabilmektedir (153). Bu ligandlar içinde EGF ve TGF- α önemli yer tutmaktadır (154). TGF- α EGF'den farklı olarak internalizasyondan sonra degrade olmamakta ve reseptörden hızla dissosiyasyon olarak

tekrar siklusa katılmaktadır. Bu şekilde tümör hücrelerinden otokrin TGF- α salınımı uzamış EGFR stimülasyonu ve heterodimerizasyona yol açmaktadır (155). Valabrega ve arkadaşlarının çalışmasında immunhistokimyasal olarak TGF- α pozitif boyanan meme kanseri hücrelerinde trastuzumabın HER2 baskılanmasını sağlayamadığı ve hücre büyümesini engelleyemediği gösterilmiştir (156).

c. p27

Hücre siklusu ve çoğalmasını kontrol eden bir CDK inhibitörü olan p27 trastuzumabın antitümör etkisine aracılık etmektedir. p27, CDK2 ile kompleks oluşturarak hücrelerde G1 arrestine ve apoptoza yol açmaktadır (157). Trastuzumab p27' nin siklinE/CDK2 aracılıklı fosforilasyonunu ve sonuç olarak ubiquitin-bağımlı degradasyonunu bloke ederek p27' nin yarıömrünü uzatmakta ve G1 arrestini indüklemektedir. Trastuzumab p27' nin inaktif halde bulunduğu sitozolden aktif halde bulunduğu nukleusa translokasyonunu da uyarmaktadır (157). Trastuzumabla tedavi edilen hücrelerde p27 ekspresyonu düzeyinin ve p27 yarı ömrünün arttığı, CDK2 düzeyinin azaldığı ve bu iki değişimin antitümöral etkiyle korele olduğu gösterilmiştir (158). Trastuzumaba dirençli hücrelerde p27 ekspresyonu düşük bulunmuştur (159), ayrıca trastuzumaba duyarlı hücrelerde antisens oligonükleotidlerle p27 artışı engellendiğinde trastuzumabın etkisinin bloke olduğu ve hücrelerin trastuzumaba dirençli hale geldiği görülmüştür (158). Daha önemlisi trastuzumaba dirençli ve p27 düzeyi düşük hücrelere eksojen p27 eklendiği zaman trastuzumaba duyarlılığın arttığı gösterilmiştir (159). Proteozom inhibitörlerinin p27 ve PTEN düzeyini arttırarak trastuzumabla sinerjistik etki gösterdiğinin (160) ve trastuzumaba dirençli meme kanseri hücrelerinde antitümöral etki oluşturduğunun görülmesi (161) üzerine bortezomible trastuzumabın kombine edildiği bir klinik çalışma başlatılmıştır (162).

d. IGF-1R

IGF-1R bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür ve meme kanserinde yüksek oranda (%87-93) eksprese edilmektedir (163-165). PI3K/Akt ve Ras/Raf/ERK/MAPK sinyal yollarını aktive edebildiği gibi, son zamanlarda HER2 pozitif meme kanserinde trastuzumab direncinde rol oynadığına dair yayınların sayısı artmaktadır. Lu ve arkadaşları IGF-1R aşırı ekspresyonu olan HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinde trastuzumabın antiproliferatif etkisinin IGF1' i düşük oranda eksprese eden hücrelere göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu, ortama IGF bağlayıcı protein-3 eklenerek IGF-1R sinyali engellendiğinde ise trastuzumab etkisinin arttığını göstermişlerdir (23). Bunun ardından gelen çalışmada ise IGF1 sinyalinin p27 ubiquitin ligaz SKP2 ekspresyonunu arttırarak p27 düzeyini azalttığı ve bu yolla trastuzumab direncine yol açtığı saptanmıştır (166). Bununla beraber Köstler ve arkadaşları HER2 pozitif metastatik meme kanserli hastalarda IGF-1R ekspresyonunun trastuzumab yanıtını predikte etmediğini bildirmişlerdir (167). Nahta ve arkadaşlarının çalışmasında trastuzumaba dirençli ve trastuzumab naiv meme kanseri hücrelerinde lapatinibin sadece EGFR ve HER2 inhibisyonu yapmakla kalmayıp, IGF-1 sinyalini de inhibe ettiği görülmüştür (168). Dahası, ortama bir anti-IGF-1 ajan eklenmesi ile lapatinibin antiproliferatif etkisi artmaktadır. Son zamanlarda yayınlanan bir başka çalışmada ise trastuzumaba dirençli meme kanseri hücrelerinde HER2, HER3 ve IGF-1R' nün bir araya gelerek heterotrimer kompleks oluşturduğu ve bunun trastuzumab direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (169). IGF-1 sinyalinin inhibe edilmesine yönelik (monoklonal Anti-IG-1R antikoru cetuxumomab ve IGF-bağlayıcı protein-3) prelinik ve klinik çalışmalar sürmektedir. (170-172).

e. Met

Met reseptör tirozin kinazı ve onun ligandı olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) meme kanserinde sıklıkla aşırı eksprese edilmektedir ve her 2 molekülün de bağımsız birer kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (173,174). Yapılan bir immunhistokimyasal çalışmada HER2 pozitif 20 meme kanserli hastanın 5' inde met aşırı ekspresyonu olduğu saptanmıştır(175). Shattuck ve arkadaşları met aşırı ekspresyonunun trastuzumab direncine yol açtığını göstermişlerdir. Ortama eksojen HGF eklenerek met reseptörleri aktive edildiğinde, trastuzumabın antiproliferatif etkisi ve p27 aktivasyonu inhibe olmakta, Akt aktivasyonu artmaktadır (176). Ayrıca trastuzumab uygulanan meme kanseri hücrelerinde bir süre sonra met reseptör aktivasyonu gelişmekte ve trastuzumaba yanıtızlık ortaya çıkmaktadır (176). Bir met kinaz inhibitörü tek başına kullanıldığında trastuzumab direnci ortadan kalkmakta, trastuzumabla birlikte kullanılması halinde ise sinerjistik büyüme inhibisyonu etkisi ortaya çıkmaktadır (176).

f. Diğer

Kemokinler bugün için bilinen en büyük sitokin ailesini oluşturan ve spesifik lökosit tiplerini aktive etmek üzere sentezlenen küçük proteinlerdir. Etkilerini spesifik reseptörleri ile gerçekleştiren bu sitokinler lökosit kemotaksisi, migrasyonu ve aktivasyonuna aracılık yaparlar. Yapılan deneysel çalışmalarda bir kemokin reseptörü olan CXCR4 ve endojen ligandı olan CXCL12' nin meme kanserinin metastatik potansiyelinde rol oynadığı gösterilmiştir (177,178). Li ve arkadaşları HER2' nin CXCR4 ekspresyonunu arttırdığını ve degradasyonunu azalttığını, ayrıca CXCR4' ün hem in vitro hem de in vivo olarak HER2-aracılı metastatik yayılım için gerekli bir molekül olduğunu bildirmişlerdir (179). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada trastuzumaba dirençli meme kanseri hücrelerinde CXCR4 aşırı aktivasyonu geliştiği,

dahası CXCR4' ün HER2' yi fosforile ettiği ve CXCR4 blokajı ile trastuzumab direncinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (180). Mevcut bulgular CXCR4' ün iyi bir hedef molekül olabileceğini düşündürmektedir (181).

Integrinler ekstrasellüler matriksle etkileşimi bulunan bir grup transmembran reseptörüdür ve hücre bölünmesi, mobilitesi ve hücre siklusunun kontrolünde rol oynar. β 1-integrin' in meme kanseri progresyonunda ve metastatik potansiyelinde rol oynadığı gösterilmiştir (182). Son zamanlarda yapılan prelinik çalışmalarda β 1-integrin' in trastuzumab direnciyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (183,184).

4. ABHS' nin gerçekleştirilememesi

Daha önce bahsedildiği gibi ABHS trastuzumabın en önemli etki mekanizmalarından biridir. Trastuzumab öncelikle tümör hücresine bağlandıktan sonra, IgG1 yapıdaki Fc kısmıyla da immun sistem hücrelerindeki reseptörlere bağlanır. Lökositlerin yüzeyinde bulunan bu Fc reseptörleri 3 gruba ayrılır: FcRI, FcRII, FcRIII. Bunlardan son ikisi ise FcRIIa, FcRIIb, FcRIIIa, FcRIIIb olmak üzere ayrılırlar. FcRIIa ve FcRIIIa monositler, makrofajlar ve NK hücreleri üzerindeki Fc reseptörlerini aktive ederek ABHS' yi başlatabilmektedirler (141).

FcRIIIa üzerinde 158. pozisyonda Valin(V)/fenialanin(F) fenotipinin ve FcRIIa üzerinde 131. pozisyonda histidin(H)/arginin(R) fenotipinin ekspresyonunun artmasına yol açan genomik tek nukleotid polimorfizmleri tanımlanmıştır. Bunlar içerisinde V alleliyle olan FcIIIa reseptörlerinin IgG1' e bağlanma affinitesi F allelinden daha fazladır ve ABHS' yi başarılı bir şekilde gerçekleştirmektedir (185). Musolino ve arkadaşları metastatik meme kanserli hastalarda Fc reseptör polimorfizmleriyle trastuzumab içeren tedavinin klinik etkinliği arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. V/V genotipi objektif yanıt oranı ve progresyonsuz sağkalımla korele bulunmuştur; ayrıca H/H genotipi ile de benzer bir ilişki saptanmıştır. Dahası bu iki olumlu genotipin (V/V

ve H/H) kombinasyonu diğer kombinasyonlara göre bağımsız olarak daha iyi objektif yanıt ve progresyonsuz sağkalımla ilişkilidir (186).

ABHS' nin önemini işaret eden diğer bir kanıt ise Scaltriti ve arkadaşlarının lapatinible ilgili prelinik çalışmasıdır (187). Bu çalışmada tek başına ya da trastuzumabla kombine uygulanan lapatinible tedavi edilen meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde inaktif HER2 reseptör akümüasyonu olduğu görülmüştür. Trastuzumabın HER2 degradesyonuna yol açtığı bilinmektedir. Trastuzumab+lapatinib kombinasyonu tüm deneklerde tedavinin 10. gününde tam tümör yanıtını sağlamıştır. Lapatinibe bağlı HER2 akümüasyonu, artmış immün aracılı trastuzumab-bağımlı sitotoksisteyi göstermektedir. Barok ve arkadaşları trastuzumabın ABHS' yi aktive ederek trastuzumab dirençli hücrelerin yıkımını sağladığını göstermişlerdir (188). ABHS trastuzumabın etkinliğinde önemli yer tutmaktadır, ancak trastuzumab direncinde nasıl rol oynadığının aydınlatılabilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamına İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda takip edilen ve meme dokusu örnekleri Patoloji Anabilim Dalı tarafından incelenerek histolojik olarak tanısı konmuş, HER2 pozitif metastatik meme kanseri olan ve birinci basamakta trastuzumab içeren tedavi alan hastalar dahil edildi. Hastaların mevcut meme dokusu bloklarında IHK yöntemi kullanılarak saptanan PTEN, PI3K ve p27 ekspresyonu ile hastalık özellikleri, tedavi yanıtı ve prognoz arasındaki ilişki araştırıldı. Bu amaçla hastalara ait parafin meme dokusu bloklarından HE kesitler alındı ve bu kesitlere IHK uygulandı.

İmmünohistokimyasal çalışma prosedürü

%10 formaldehid ile fikse edilmiş parafin bloklara gömülü dokulardan 4µ kalınlığında kesitler artı işaretli (pozitif) lamlara alındı. Lamlar etüvde 56 °C' de bir gece bekletildi. Daha sonra şalelere alınarak 2 kez 15 dakika ksilen, 3 kez 5' er dakika %96' lık alkolde bekletilerek deparafinize edildi ve distile suya alınarak rehidratasyon sağlandı. Mikrodalga fırında %10'luk, PH değeri 6, 1 litre sitrat buffer solusyonuna alınan lamlar, p27 primer antikoru için 35 dakika, PTEN primer antikoru için 20 dakika tutularak antijenin geri kazanımı sağlandı. Bu işlemden sonra kesitler oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Tekrar şalelere alınan lamlar distile sudan geçirildikten sonra kenarları kurulanıp doku sınırları pappen kalemle çizildikten sonra inkübasyon kabına dizildi. Her dokunun üzerine %3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılıp nemli ortamda 10 dakika beklenerek endojen peroksidaz blokajı sağlandı. Distile suda yıkandıktan sonra tamponlu fosfat buffer (PBS) solusyonunda 5 dakika bekletildi. Silkelenerek tekrar inkübasyon kabına alınan kesitlere 1/60 oranında dilüe edilmiş PTEN (28H6, Gene Tex, GTX73862), 1/20 oranında dilüe edilmiş p27 (1B4, Novacastra, NCL-P27) primer antikorları damlatıldı ve 2,5 saat inkübe edildi. Daha

sonra lamlar, içinde PBS bulunan şalelere alındı. Silkelenerek inkübasyon kabına alınan kesitlere link-lable damlatılıp 20 dakika bekletildi. PBS' ye alındıktan sonra kesitlere straptavidin damlatılarak 20 dakika inkübasyon kabında bekletildi. Tekrar PBS' ye alınıp 1 ml distile su 1 damla AEC buffer ve 2 damla AEC kromojen 1 damla konsantre hidrogen peroksit damlatılarak hazırlanan solusyon kesitlere damlatıldı. Zemin boyanmasını önlemek amacıyla kızaran örnekler distile su şalelerine alındı. Mayer hematoksilen ile 2 dakika tutularak karşıt boyaları yapıldı. Musluk suyunda morartma işlemi tamamlandıktan sonra su bazlı kapama vasatı (aquesmount) ile kapatıldı.

PIK3CB poliklonal primer antikoruna için etüvde 56 °C de bir gece bekletilen kesitler Leica Bond Max otomatik boyama cihazına alındı. PH'sı 8 olan EDTA içinde 40 dakika tutularak antijenin geri kazanımı sağlandı. Kesitler %3'lük hidrogen peroksit ile 10 dakika, tamponlu fosfat buffer (PBS) solusyonunda 10 dakika bekletildikten sonra 1/50 oranında dilüe edilmiş PIK3CB (PAB3212, Abnova) primer antikoruna damlatıldı ve 60 dakika inkübe edildi. Sonrasında PBS ile 10 dakika, post primer ile 8 dakika, PBS ile 10 dakika, polimer ile 8 dakika, PBS ile 5 dakika, DAB kromojen ile 6 dakika, distile su ile 10 dakika, DAB enhancer ile 7 dakika, PBS ile 10 dakika, Mayer hematoksilen ile 13 dakika ve distile su ile 10 dakika yıkanıp lamlar cihazdan alındı. Şaleleye alınan kesitler %96'lık alkol ve ksilenden geçirildikten sonra sonra ksilen bazlı kapama vasatı (conculmount) ile kapatıldı.

Tüm HE ve IHK boyalı kesitler 2 patolog tarafından histolojik grade, hormon durumları ve c-erb B2 sonuçları bilinmeden kör olarak incelendi. Tüm olgularda her üç primer antikor için invaziv alan, insitu alan ve çevre meme dokusu ayrı ayrı değerlendirildi. PTEN ve p27 ile çekirdek, PIK3CB ile sitoplazmik olarak boyanma elde edildi. Kontrol olarak PTEN için normal prostat dokusu, p27 için normal tonsil

dokusu ve PIK3CB için karsinom içeren meme dokusu kullanıldı. Boyanma yoğunlukları farklı olduğu için skorlama yapıldı. PTEN için semikantitatif olarak pozitif boyanan hücre yüzdesi ve boyanma yoğunluklarının çarpımı sonucu elde edilen sonuç immünreaktif skor (İRS) olarak kaydedildi. Boyanma yoğunlukları 0 (negatif), 1 (zayıf pozitif), 2 (orta yoğunlukta pozitif), 3 (kuvvetli pozitif); pozitif boyanma yüzdesi ise 0 (<%5), 1 (%5-25), 2(%26-50), 3(%51-75), 4 (>%75) olarak derecelendirildi. Elde edilen değerler temel alınarak IRS 0-3 arası 0, IRS 4-6 arası 1+, IRS 7-9 arası 2+, IRS 10-12 arası ise 3+ olarak kaydedildi. IRS sonucu 0 veya 1+ ise PTEN negatif, 2+ veya 3+ ise PTEN pozitif olarak değerlendirildi (24,189). P27 için pozitif nuklear boyanma gösteren hücre oranı \geq %50 ise pozitif boyanma, <%50 ise negatif boyanma kabul edildi (190). PI3K içinse pozitif sitoplazmik boyanan hücre oranı \geq %50 ise pozitif boyanma, <%50 ise negatif boyanma kabul edildi (134).

Genel sağkalım (OS) üç gruba ayrılarak ayrı ayrı değerlendirildi. Buna göre ilk meme kanseri tanısı tarihinden (OS1), metastatik hastalık tanısı tarihinden (OS2) ve trastuzumab içeren tedavinin başlandığı tarihten (OS3) ölüm veya son izlem tarihine kadar geçen süre olarak hesaplandı. Progresyona kadar geçen süre (TTP) trastuzumab içeren tedavinin başlandığı tarihten hastalık progresyonunun saptandığı tarihe kadar geçen süre olarak tanımlandı. Rekürrense kadar geçen süre (TTR) başlangıçta metastatik hastalığı bulunmayan hastalar için hesaplandı ve meme kanserinin ilk tanı konduğu tarihten hastalığın metastatik olduğu tarihe kadar geçen süre olarak belirlendi. İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 11.0 kullanıldı.

BULGULAR

Hastaların özellikleri ve tümör karakteristikleri tablo 5' te görülmektedir. Hastaların tümör karakteristikleri içerisinde, kayıtlarında o parametreye ait bilgi yer almayan ya da başlangıçta metastatik hastalık bulunması nedeniyle primer tümöre yönelik inceleme yapılmayan hastaların ilgili parametreye dair analiz bilgisi tablo sütununda "bilinmeyen" olarak eklendi. Medyan yaş 61' di. Çalışmaya dahil edilen hastaların %80' i (n=20) postmenapozaldi. Yirmibeş hastanın 23' üne (%92) primer tümöre yönelik cerrahi, 8' ine (%32) sentinel lenf nodu disseksiyonu ve 19' una (%76) aksiler lenf nodu disseksiyonu uygulanmıştı.

Tümör karakteristikleri incelendiğinde hastaların tama yakınında (%96, n=24) histoloji invaziv duktal karsinomdu. Tümör gradına bakıldığında grad III tümörler ilk sırayı oluşturuyordu (n=13, %52). On hastada (%40) tümör gradı II iken, grad I tümör saptanmadı, 2 hastada ise tümör gradına ait bilgi mevcut değildi. Onyeddi hastada (%68) HR pozitif, 8 hastada (%32) ise negatifti. 15 hastada (%60) visseral organ metastazı mevcuttu.

Tablo 6' da hastalara uygulanan tedavilerin özellikleri görülmektedir. Hastaların %40' ı daha önce adjuvan kemoterapi almıştı. Metastatik olduktan sonra trastuzumabla uygulana kemoterapi ajanları incelendiğinde 18 hastaya (%72) taksan (paklitaksel veya dozetaksel), 3 hastaya (%12) kapesitabin, 1 hastaya (%4) vinorelbin, 3 hastaya (%12) ise hormonal tedavi (letrozol ve eksamestan) uygulanmıştı. Trastuzumab içeren tedaviye yanıt değerlendirildiğinde 17 hastada (%68) parsiyel yanıt, 1 hastada (%4) tam yanıt, 3 hastada (%12) stabil yanıt, 4 hastada ise (%16) ise progresif hastalık saptandı. Progresyon sonrası 15 hasta (%60) trastuzumab içeren tedavi, 5 hasta (%20) ise lapatinib içeren tedavi almıştı.

PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu analizleri tablo 7' de görülmektedir. Tüm hastaların bloklarında immunhistokimya çalışması için yeterli tümör dokusu mevcuttu. Doku bloklarında yeterli in situ komponent veya çevre doku yer almayan hastalarda bu komponentlere immunhistokimyasal inceleme uygulanmadı. IRS' a göre kategorilendirildiğinde invaziv tümör komponentinde hastaların %52' sinde (n=13) PTEN boyanma derecesi 0, %24' ünde (n=6) 1+, %12' sinde (n=3) 2+ ve %12' sinde (n=3) 3+ olarak bulundu. Pozitif veya negatif oluşuna göre değerlendirildiğinde ise 6 hasta (%24) PTEN (+), 19 hasta (%76) PTEN negatifti. P27 ekspresyonuna bakıldığında hastaların %20' si (n=5) p27 pozitif. Buna karşın 24 hasta (%96) PI3K pozitif olarak saptandı.

Hastaların invaziv tümör komponenti, in situ tümör komponenti ve çevre dokudaki PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi. IRS kriter olarak alınarak değerlendirildiğinde in situ PTEN ile çevre PTEN arasında anlamlı korelasyon saptandı (korelasyon katsayısı: 0.68, $p=+0.021$). İnvaziv PTEN ve in situ PTEN arasında veya invaziv PTEN ile çevre PTEN arasında ise ilişki saptanmadı.

IRS kategorik hale getirildiğinde (0, 1+, 2+, 3+) ise in situ PTEN ile çevre PTEN arasında ve invaziv PTEN ile çevre PTEN arasında anlamlı korelasyon tespit edildi (sırasıyla korelasyon katsayısı: +0.612, $p=0.036$ ve korelasyon katsayısı: -0.389, $p=0.042$). İn situ PTEN ile invaziv PTEN arasında ise korelasyon saptanmadı.

PTEN durumu pozitif/negatif oluşu kriter olarak alınarak değerlendirildiğinde ise in situ PTEN ile çevre PTEN arasında anlamlı korelasyon bulundu (korelasyon katsayısı: +0.714, $p=0.007$).

İnvaziv tümör, in situ tümör ve çevre komponentleri arasında P27 ve PI3K pozitifliği açısından ilişki saptanmadı.

İnvaziv tümör komponentindeki PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonunun kendi aralarındaki ilişkisi incelendiğinde; PTEN ile p27 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu (korelasyon katsayısı: +0.421, p=0.036). PTEN ile PI3K ve p27 ile PI3K arasında ise ilişki saptanmadı.

Trastuzumab tedavisine yanıt ile PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu arasındaki ilişki incelendi. RECIST kriterlerine göre tam yanıt ve parsiyel yanıt saptanan hastalar “tedaviye yanıtı” olarak değerlendirildi. Trastuzumaba yanıtı ve yanıtı olmayan hastalar PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulunmadı (tablo 8).

PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonunu ile tümör karakteristikleri arasındaki ilişki incelendiğinde;

PTEN ile tümör çapı (T evresi) arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulundu, diğer faktörler ile anlamlı bir ilişki saptanmadı (tablo 9)

P27 ile tümör çapı (T evresi) arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulundu, diğer faktörler ile anlamlı bir ilişki saptanmadı (tablo 10)

PI3K ile tümör çapı (T evresi) arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulundu, diğer faktörler ile anlamlı bir ilişki saptanmadı (tablo 11)

Hastaların sağkalım analizlerine bakıldığında medyan OS1 44 ay (%95 CI: 14-73); , medyan OS2 18 ay (%95 CI: 13-23), medyan OS3 17 ay (%95 CI: 12-22) ve medyan TTP 15 ay (%95 CI: 12-17) olarak bulundu (tablo 12, grafik 1-4). OS1 ve TTP, trastuzumab içeren tedaviye yanıtı olmayan hastalarda yanıt vermeyen hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak uzun bulundu. İki grup arasında OS2 ve OS3 açısından anlamlı farklılık bulunmadı (tablo 13, grafik 5-8). HR durumuna göre yapılan sağkalım analizlerinde; HR pozitif ve negatif hasta grubu karşılaştırıldığında OS1, OS2, OS3 ve TTP açısından anlamlı farklılık saptanmadı (tablo 14, grafik 9-12). ER

pozitif/PR pozitif hasta grubu ile ER negatif/PR negatif hasta grubu karşılaştırıldığında OS1, OS2, OS3 ve TTP açısından farklılık bulunmadı (Tablo 15, grafik 13-16).

İnvaziv tümör komponentindeki PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu pozitifliği ve negatifliği arasında OS (OS1, OS2, OS3), TTP ve TTR açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (tablo 16-18, grafik 17-30) (TTR analizi için başlangıçta metastatik hastalığı bulunmayan hastalar belirlendiğinde, saptanan 16 hastanın tümü PI3K pozitif olduğu için PI3K ekspresyonuna yönelik TTR analizi yapılmadı).

OS (OS1, OS2, OS3) ve TTP' nin HR durumu (pozitif ve negatif oluşuna göre), visseral metastaz varlığı, uygulanan tedavi (taksan içeren ve içermeyen), trastuzumab içeren tedaviye yanıt, PTEN ekspresyonu (pozitif ve negatif oluşuna göre), p27 pozitifliği (pozitif ve negatif oluşuna göre) ve PI3K pozitifliği (pozitif ve negatif oluşuna göre) ile univariet analizinde hiçbir faktörle anlamlı ilişki tespit edilmedi.

Tablo 5 – Hasta ve tümör karakteristikleri

	n	%
Medyan yaş	61 (28-80)	
Menapoz durumu		
Premenapoz	5	20
Postmenapoz	20	80
Daha önce yapılan cerrahi		
Meme koruyucu cerrahi	15	60
Basit mastektomi	2	8
Modifiye radikal mastektomi	6	24
Yok	2	8
Sentinel lenf nodu disseksiyonu (var / yok)	8/17	32/68
Aksiller küretaj (var / yok)	19/6	76/24
Histoloji		
İnvaziv duktal karsinom	24	96
Diğer	1	4
Grad (I / II / III / bilinmiyor)	0 / 10 / 13 / 2	0 / 40 / 52 / 8
Tümör çapı		
0-2 cm (T1)	8	32
2-5 cm (T2)	12	48
>5 cm (T3)	2	8
Bilinmiyor	3	12
Lenfatik invazyon (var / yok / bilinmiyor)	14/9/2	56/36/8
Vasküler invazyon (var / yok / bilinmiyor)	7/16/2	28/64/8
Perinöral invazyon (var / yok / bilinmiyor)	4/19/2	16/76/8
Aksiller lenf nodu metastazı (var / yok / bilinmiyor)	13/9/3	52/36/12
Çıkarılan aksiller lenf nodu sayısı		
<10	6	24
≥10	16	64
Bilinmiyor	3	12
Metastatik aksiller lenf nodu sayısı		
0 (N0)	9	36
1-3 (N1)	7	28
4-9 (N2)	6	24
>10 (N3)	0	0
Bilinmiyor	3	12
Hormon reseptörü durumu		
ER+/ PR+	7	28
ER+/ PR-	7	28
ER- / PR+	3	12
ER- / PR-	8	24
Uzak metastaz lokalizasyonu		
Kemik	6	24
Yumuşak doku	4	16
Visseral	15	60

Tablo 6 – Tedavi karakteristikleri

	n	%
Daha önce alınmış adjuvan kemoterapi		
Var	10	40
Yok	15	60
Antrasiklin içeren adjuvan kemoterapi		
Var	10	40
Yok	15	60
Taksan içeren adjuvan kemoterapi		
Var	2	8
Yok	23	92
Trastuzumabla uygulanan kemoterapi		
Taksan	18	54
Kapesitabin	3	12
Vinorelbin	1	4
Hormonal tedavi	3	12
Trastuzumab içeren tedaviye yanıt		
Parsiyel yanıt	17	68
Tam yanıt	1	4
Stabil hastalık	3	12
Progresif hastalık	4	16
Progresyon sonrası trastuzumab kullanımı		
Var	15	60
Yok	10	40
Progresyon sonrası lapatinib kullanımı		
Var	5	20
Yok	20	80

Tablo 7 – PTEN, p27 ve PI3K ekspresyon sonuçları

	İnvaziv tümör	İn situ tümör	Çevre doku
PTEN durumu			
IRS skoruna göre			
0-3 (0)	13	3	1
4-6 (1+)	6	1	1
7-9 (2+)	3	2	2
10-12 (3+)	3	2	13
Pozitif/negatif durumuna göre			
Pozitif	6	4	15
Negatif	19	4	2
P27 durumu			
Pozitif	5	3	13
Negatif	20	5	4
PI3K durumu			
Pozitif	24	8	16
Negatif	1	0	1

Tablo 8 - Trastuzumab yanıtı ile PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu arasındaki ilişki

	Trastuzumaba yanıt var (n)	Trastuzumaba yanıt yok (n)	p
PTEN durumu			0.086
Pozitif	6	0	
Negatif	12	7	
p27 durumu			0.663
Pozitif	4	1	
Negatif	14	6	
PI3K durumu			0.533
Pozitif	17	7	
Negatif	1	0	

Tablo 9 – PTEN ekspresyonu ile tümör karakteristikleri arasındaki ilişki

	PTEN(+)	PTEN(-)	p
Tümör çapı			
Ortalama ± SD	2.75 ± 1.28 cm	2.49 ± 1.39 cm	0.74
Tümör çapı			0.009
0-2 cm (T1)	1	7	
2-5 cm (T2)	3	9	
>5 cm (T3)	0	2	
Bilinmiyor	2	1	
Grade			0.25
I	0	0	
II	1	9	
III	4	15	
Bilinmiyor	1	1	
Lenfatik invazyon			0.67
Var	3	11	
Yok	2	13	
Bilinmiyor	1	1	
Vasküler invazyon			0.14
Var	3	4	
Yok	2	14	
Bilinmiyor	1	1	
Perinöral invazyon			0.34
Var	0	4	
Yok	5	14	
Bilinmiyor	1	1	
Aksiller lenf nodu metastazı			0.55
Var	2	11	
Yok	2	7	
Bilinmiyor	2	1	
Hormon reseptör durumu			0.57
Pozitif	6	11	
Negatif	0	8	
Hormon reseptör durumu			0.051
ER+/ PR+	4	3	
ER+/ PR-	1	5	
ER- / PR+	1	3	
ER- / PR-	0	8	
Uzak metastaz lokalizasyonu			0.81
Kemik	2	4	
Yumuşak doku	1	2	
Visseral	3	13	

Tablo 10 – p27 ekspresyonu ile tümör karakteristikleri arasındaki ilişki

	P27(+)	P27(-)	p
Tümör çapı			
Ortalama ± SD	2.72 ± 1.22 cm	2.50 ± 1.40 cm	0.77
Tümör çapı			0.003
0-2 cm (T1)	1	7	
2-5 cm (T2)	3	9	
>5 cm (T3)	0	2	
Bilinmiyor	1	2	
Grade			0.63
I	0	0	
II	2	8	
III	3	10	
Bilinmiyor	0	2	
Lenfatik invazyon			0.28
Var	2	12	
Yok	3	6	
Bilinmiyor	0	2	
Vasküler invazyon			0.50
Var	1	6	
Yok	4	12	
Bilinmiyor	0	2	
Perinöral invazyon			0.65
Var	1	3	
Yok	4	15	
Bilinmiyor	0	2	
Aksiller lenf nodu metastazı			0.09
Var	4	9	
Yok	0	9	
Bilinmiyor	1	2	
Hormon reseptör durumu			0.62
Pozitif	4	13	
Negatif	1	7	
Hormon reseptör durumu			0.32
ER+/ PR+	3	4	
ER+/ PR-	1	6	
ER- / PR+	0	3	
ER- / PR-	1	7	
Uzak metastaz lokalizasyonu			0.95
Kemik	1	5	
Yumuşak doku	1	3	
Visseral	3	12	

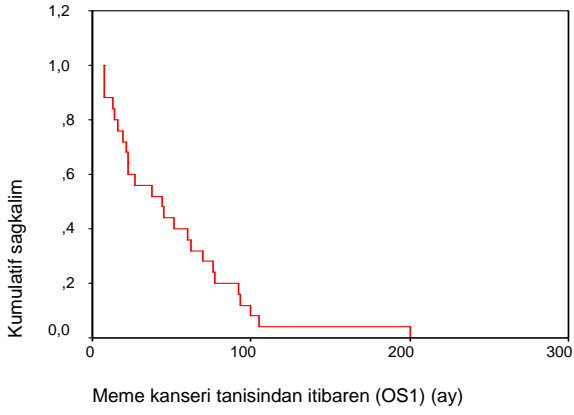
Tablo 11 – PI3K ekspresyonu ile tümör karakteristikleri arasındaki ilişki

	PI3K(+)	PI3K(-)	p
Tümör çapı			
Ortalama ± SD	2.52 ± 1.38 cm	2.80	0.85
Tümör çapı			<0.001
0-2 cm (T1)	8	0	
2-5 cm (T2)	11	1	
>5 cm (T3)	2	0	
Bilinmiyor	3	0	
Grade			0.56
I	0	0	
II	10	0	
III	12	1	
Bilinmiyor	2	0	
Lenfatik invazyon			0.60
Var	13	1	
Yok	9	0	
Bilinmiyor	2	0	
Vasküler invazyon			0.30
Var	6	1	
Yok	16	0	
Bilinmiyor	2	0	
Perinöral invazyon			0.82
Var	4	0	
Yok	18	1	
Bilinmiyor	2	0	
Aksiller lenf nodu metastazı			0.40
Var	13	0	
Yok	8	1	
Bilinmiyor	3	0	
Hormon reseptör durumu			0.64
Pozitif	16	1	
Negatif	8	0	
Hormon reseptör durumu			0.44
ER+/ PR+	7	0	
ER+/ PR-	6	1	
ER- / PR+	3	0	
ER- / PR-	8	0	
Uzak metastaz lokalizasyonu			0.19
Kemik	5	1	
Yumuşak doku	3	0	
Visseral	12	0	

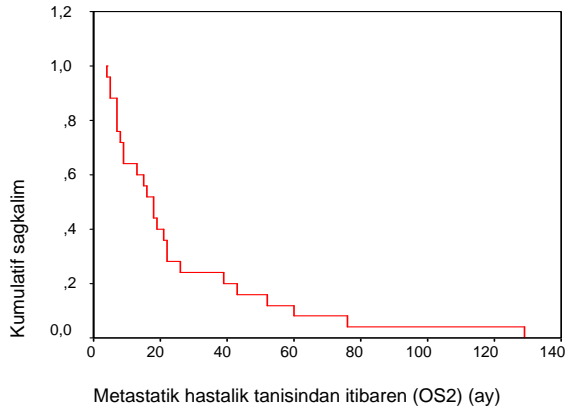
Tablo 12 – Sağkalım sonuçları

Medyan sağkalım (OS)	
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	44 ay (%95 CI: 14-73)
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	18 ay (%95 CI: 13-23)
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	17 ay (%95 CI: 12-22)
Medyan progresyona kadar olan süre (TTP)	15 ay (%95 CI: 12-17)

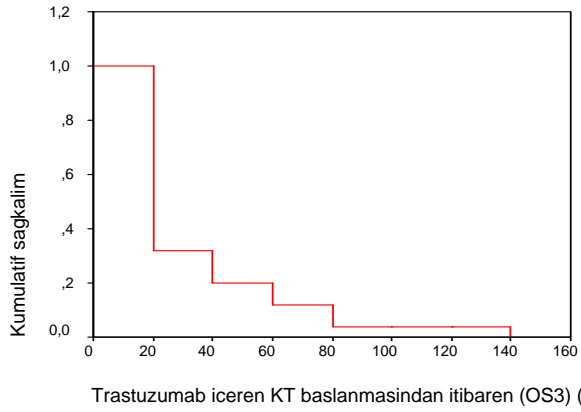
Grafik 1 – Hastaların OS1 dağılımı



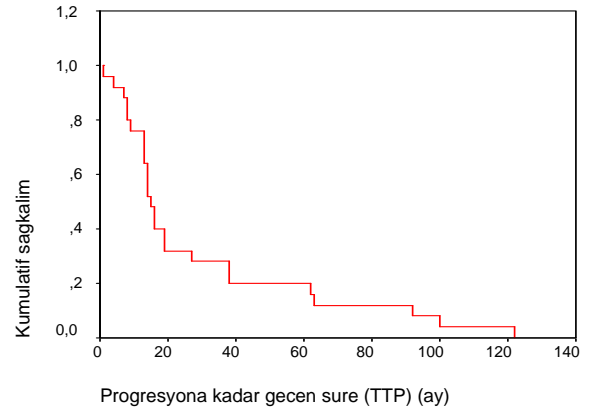
Grafik 2 – Hastaların OS2 dağılımı



Grafik 3 - Hastaların OS3 dağılımı



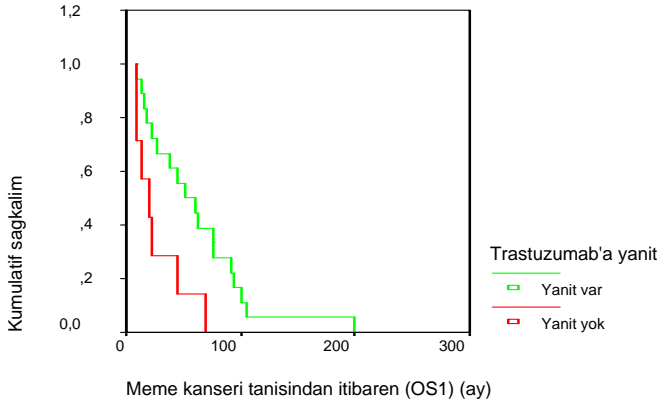
Grafik 4 - Hastaların TTP dağılımı



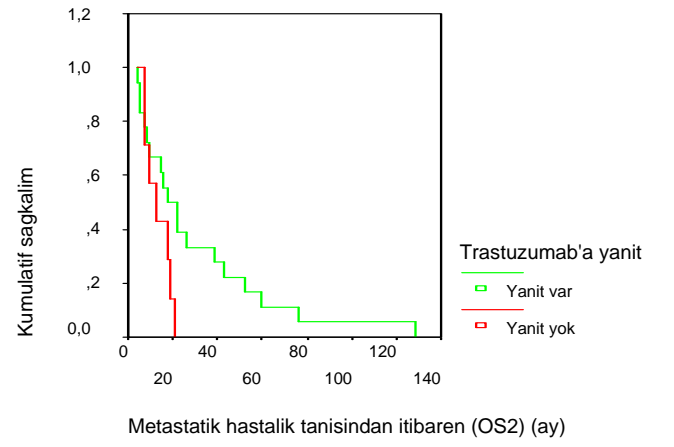
Tablo 13 – Trastuzumab yanıtı ile sağkalım arasındaki ilişki

	Yanıt var	Yanıt yok	p
Medyan sağkalım (OS)			
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	51 ay	21 ay	0.016
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	18 ay	13 ay	0.08
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	17 ay	12 ay	0.13
Medyan progresyona kadar geçen süre (TTP)	19 ay	9 ay	0.006

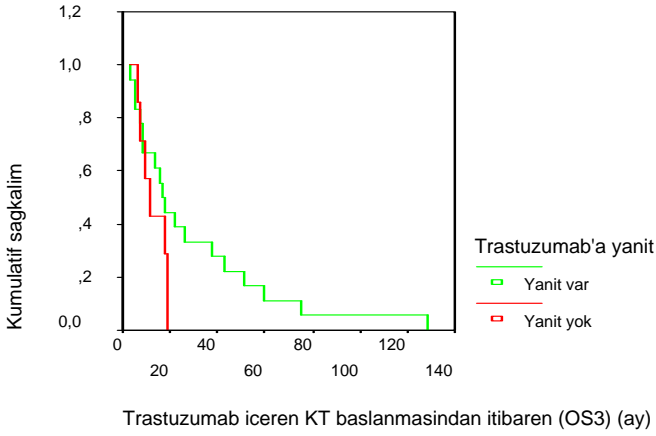
Grafik 5 – Trastuzumab yanıtı ve OS1 ilişkisi



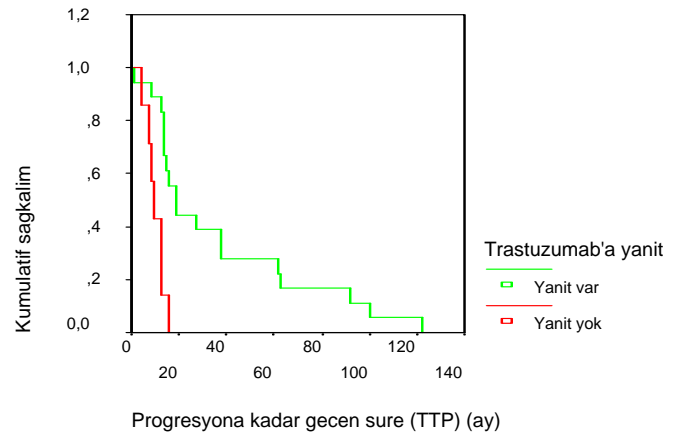
Grafik 6 - Trastuzumab yanıtı ve OS2 ilişkisi



Grafik 7 - Trastuzumab yanıtı ve OS3 ilişkisi



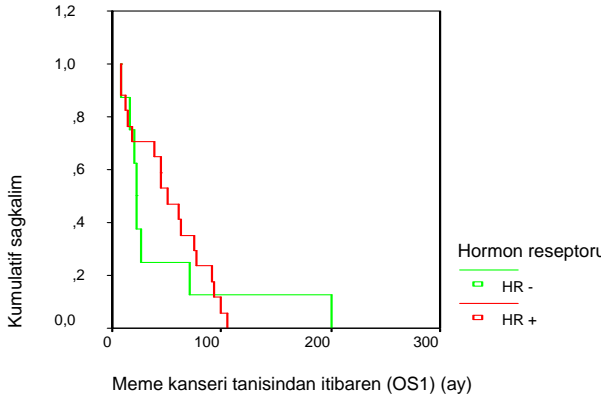
Grafik 8 - Trastuzumab yanıtı ve TTP ilişkisi



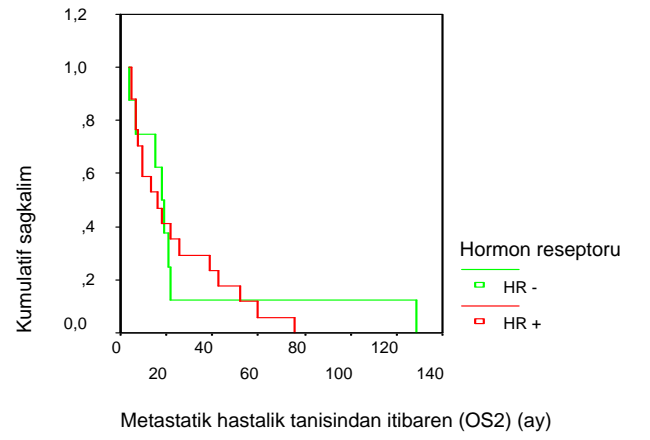
Tablo 14 – Hormon reseptörü (HR) durumu ile sağkalım arasındaki ilişki

	HR pozitif	HR negatif	p
Medyan sağkalım (OS)			
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	51 ay	22 ay	0.72
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	16 ay	18 ay	0.84
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	16 ay	18 ay	0.73
Medyan progresyona kadar geçen süre (TTP)	14 ay	16 ay	0.73

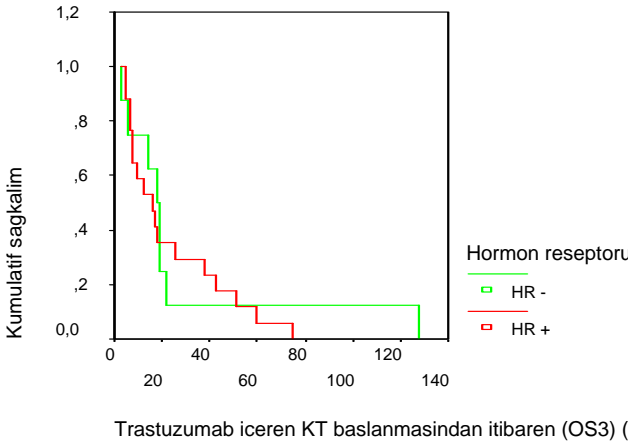
Grafik 9 – HR durumu ve OS1 ilişkisi



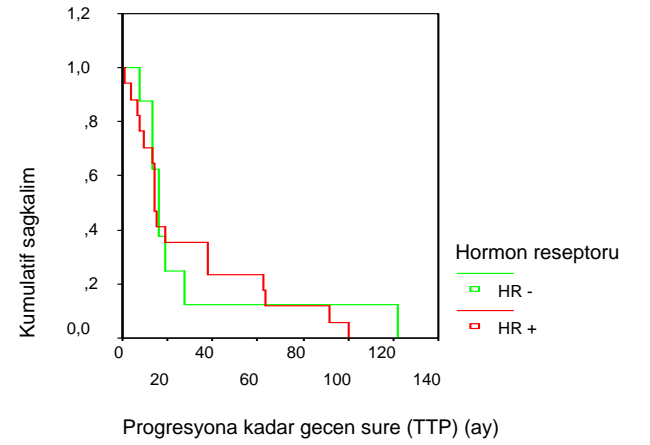
Grafik 10 – HR durumu ve OS2 ilişkisi



Grafik 11 – HR durumu ve OS3 ilişkisi



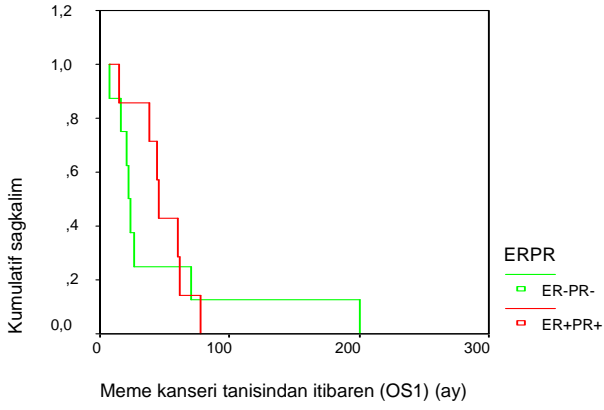
Grafik 12 – HR durumu ve TTP ilişkisi



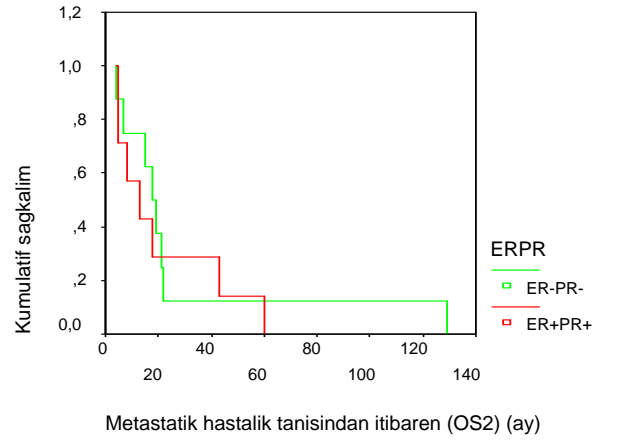
Tablo 15 – ER/PR durumu ile sağkalım arasındaki ilişki

	ER +/PR +	ER -/PR -	p
Medyan sağkalım (OS)			
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	45 ay	22 ay	0.65
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	13 ay	18 ay	0.66
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	12 ay	18 ay	0.60
Medyan progresyona kadar geçen süre (TTP)	14 ay	16 ay	0.95

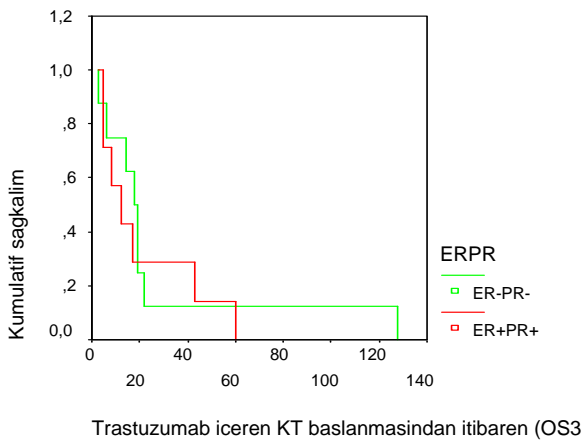
Grafik 13 - ER/PR durumu ve OS1 ilişkisi



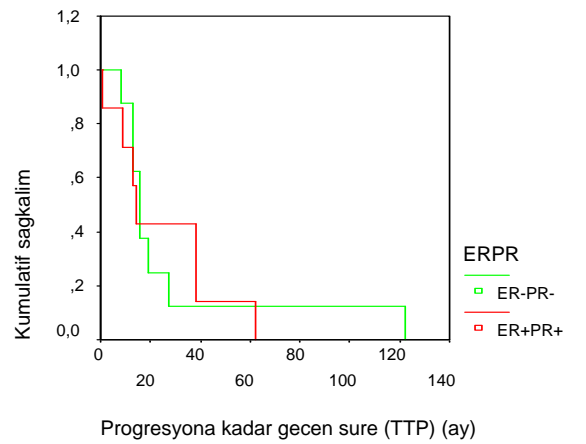
Grafik 14 - ER/PR durumu ve OS2 ilişkisi



Grafik 15 - ER/PR durumu ve OS3 ilişkisi



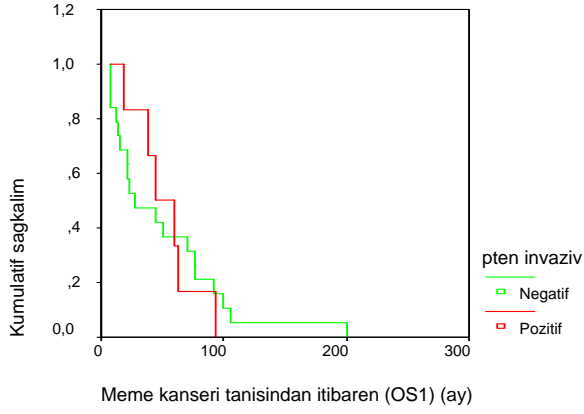
Grafik 16 - ER/PR durumu ve TTP ilişkisi



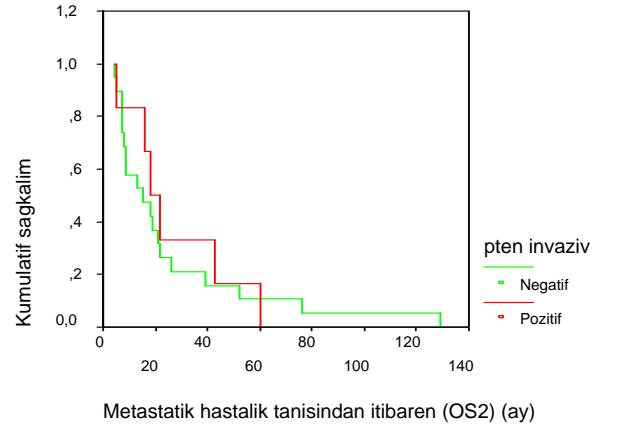
Tablo 16 – Sağkalım sonuçları ile PTEN ekspresyonu arasındaki ilişki

	PTEN(+)	PTEN(-)	p
Medyan sağkalım (OS)			
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	45 ay	27 ay	0.91
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	18 ay	15 ay	0.74
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	17 ay	14 ay	0.87
Medyan rekürrense kadar geçen süre (TTR)	57 ay	31	0.77
Medyan progresyona kadar geçen süre (TTP)	19 ay	14 ay	0.73

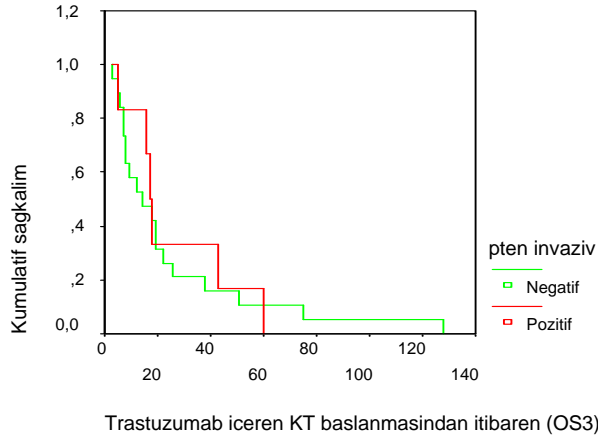
Grafik 17 – PTEN ve OS1 ilişkisi



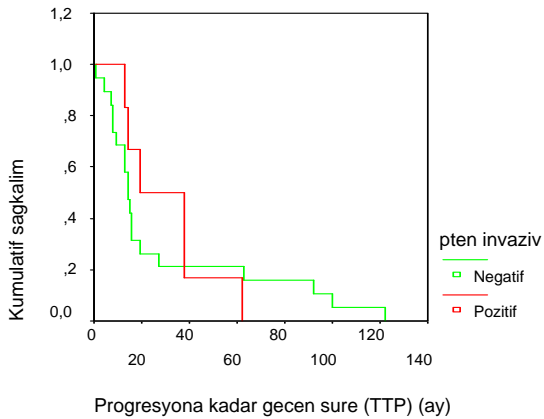
Grafik 18 – PTEN ve OS2 ilişkisi



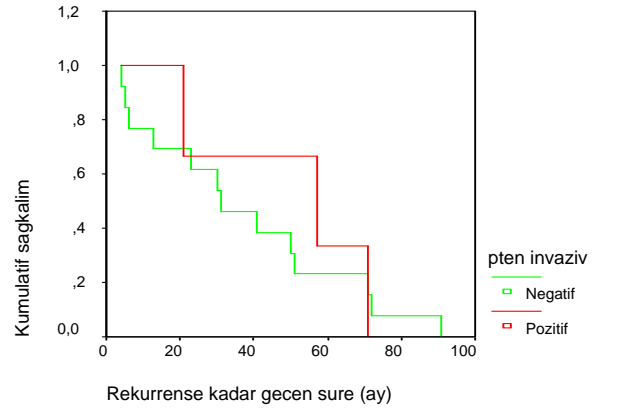
Grafik 19 – PTEN ve OS3 ilişkisi



Grafik 20 – PTEN ve TTP ilişkisi

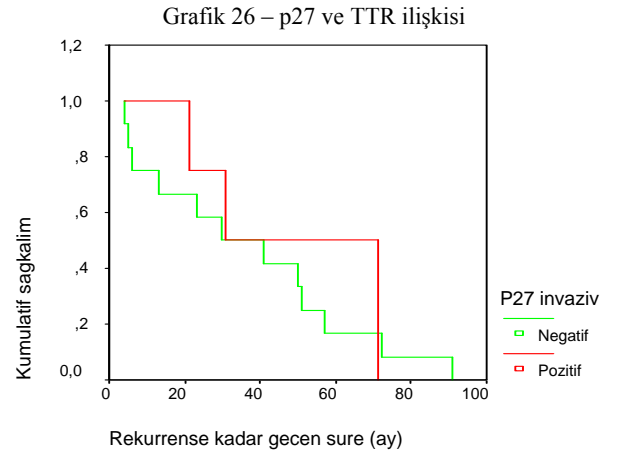
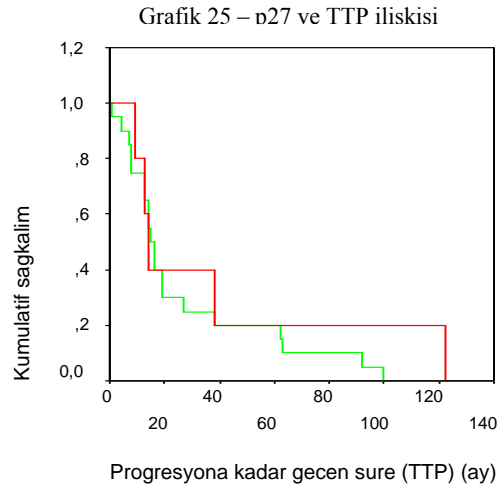
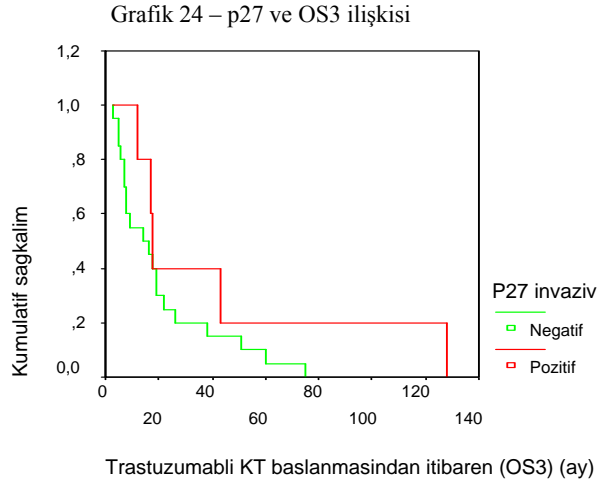
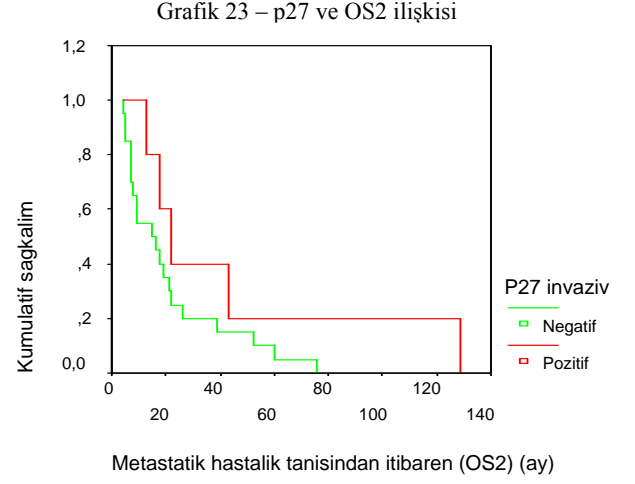
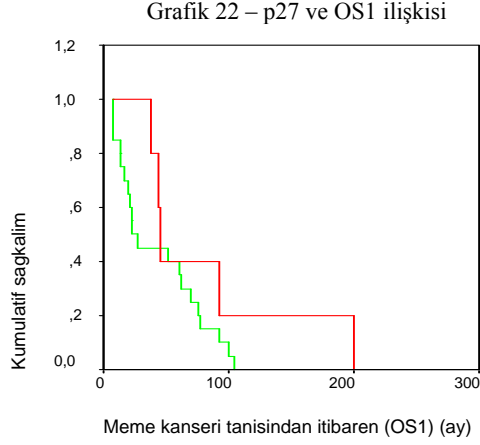


Grafik 21 – PTEN ve TTR ilişkisi



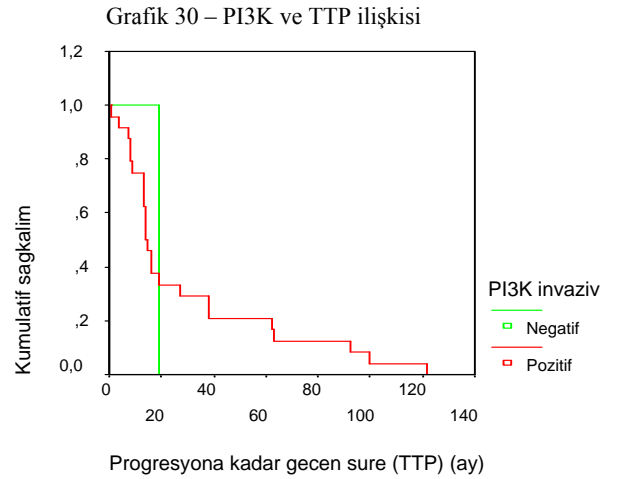
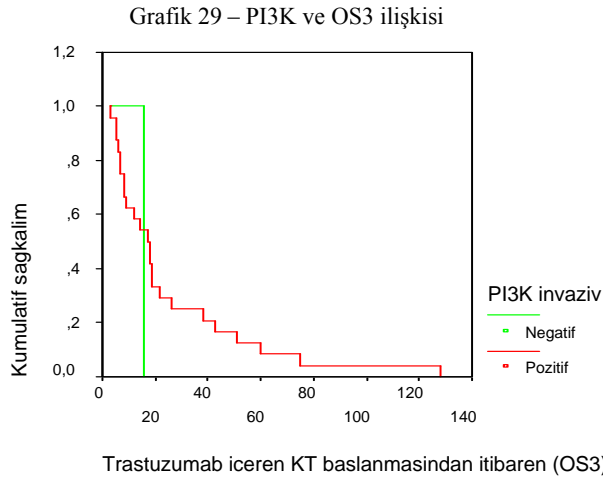
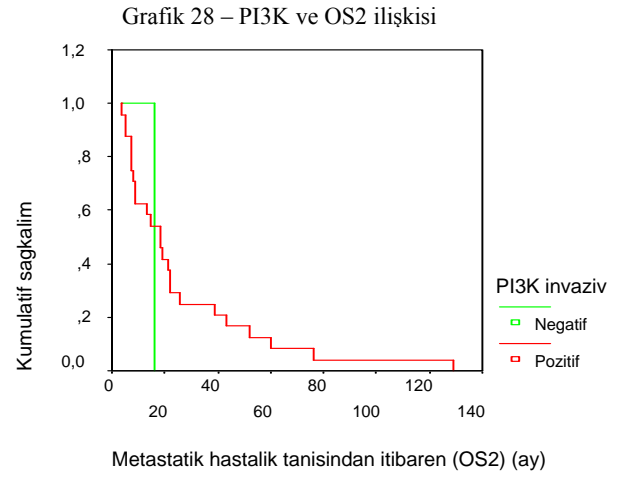
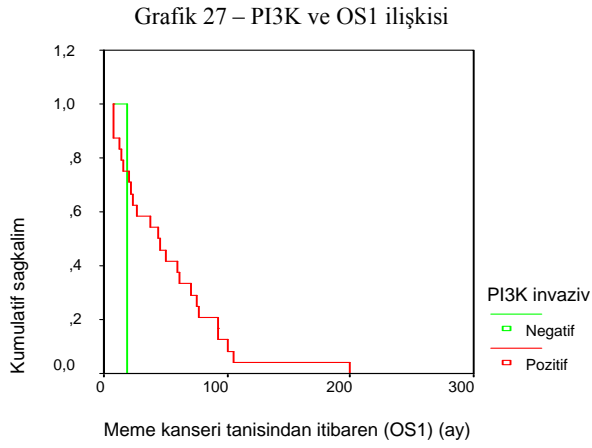
Tablo 17 - Sağkalım sonuçları ile p27 ekspresyonu arasındaki ilişki

	P27(+)	P27(-)	p
Medyan sağkalım (OS)			
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	45 ay	23 ay	0.17
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	22 ay	15 ay	0.17
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	18 ay	14 ay	0.87
Medyan rekürrense kadar geçen süre (TTR)	31 ay	30 ay	0.71
Medyan progresyona kadar geçen süre (TTP)	14 ay	15 ay	0.44



Tablo 18 - Sağkalım sonuçları ile PI3K ekspresyonu arasındaki ilişki

	PI3K(+)	PI3K(-)	p
Medyan sağkalım (OS)			
Meme kanseri tanısından itibaren (OS1)	44 ay	19 ay	0.20
Metastatik hastalık tanısından itibaren (OS2)	18 ay	16 ay	0.61
Trastuzumab tedavisinden itibaren (OS3)	17 ay	16 ay	0.62
Medyan progresyona kadar geçen süre (TTP)	14 ay	19 ay	0.95



TARTIŞMA

Yapılan çok sayıdaki çalışmalarda sporadik meme kanserinde PTEN kaybı %15-48 arasında bildirilmiştir (127,128,130,191). HER2 pozitif meme kanserinde ise PTEN ekspresyonunun önemi son zamanlarda anlaşılmaya başlanmıştır. PTEN ekspresyonunun değerlendirildiği üç çalışmada HER2 pozitif meme kanserinde PTEN kaybı sıklığı sırasıyla %52, %64 ve %86 olarak bildirilmiştir (133,134,136). PTEN ekspresyonunun değerlendirildiği ilk çalışmalarda ekspresyon kriterleri olarak boyanma yoğunluğu (kuvvetli, orta derecede, zayıf) ve boyanma dağılımı [diffüz (>%50 boyanma), bölgesel (%15-50 boyanma) ve fokal (<%15 boyanma)] kullanılmıştır (128,191). 2004' te Nagata ve arkadaşları IRS' u tanımlandıktan sonra (24) yapılan bir çok çalışmada ise ekspresyon kriteri olarak IRS kullanılmıştır. Ancak boyanma kriteri HER2 pozitif meme kanserinde PTEN kaybının göreceli yüksek oluşunu açıklamamaktadır, çünkü 2004' ten sonra IRS kullanılarak yapılan çalışmalarda da sporadik meme kanserinde PTEN kaybı sıklığı ilk çalışmalarla benzer bulunmuştur (32,131). Çalışmamız HER2 pozitif metastatik meme kanserli ve birinci basamakta trastuzumab içeren tedavi uygulanmış olan 25 hastayı içeriyordu. İmmunhistokimyasal incelemelerde hasta grubunun %76' sında PTEN kaybı saptandı ve sonuç literatürle uyumluydu. PTEN eksikliğinin göreceli yüksek oluşu muhtemelen HER2 meme kanserinin biyolojik farklılığından kaynaklanmaktadır.

PTEN kaybına yol açan PTEN mutasyonları sporadik meme kanserinde nadir görülmesine karşın heterozigotluk kaybı, PTEN haploeksikliği ve epigenetik PTEN downmodulasyonu sık rastlanan mekanizmalardır (129). PTEN' de meydana gelen genetik ve epigenetik onkojenik değişikliklerin erken dönemde mi geç dönemde mi geliştiği bilinmemektedir. Chung ve arkadaşlarının 88 invaziv duktal karsinom ve 13 in situ duktal karsinomlu hastayı içeren çalışmalarında invaziv duktal karsinomlu

hastalarda PTEN ekspresyonu kaybı oranını %32 olarak bildirilmiştir, in situ duktal karsinomlu hastalarda ise PTEN kaybı saptanmamıştır (127). Bir başka çalışmada ise bu oranlar sırasıyla %38 ve %11 olarak bildirilmiştir (192). Diğer çalışmalardan farklı olarak hasta grubumuzda PTEN ekspresyonu invaziv karsinom komponentiyle beraber mevcut olan in situ komponent ve normal çevre meme dokusunda ayrı ayrı değerlendirildi. Yirmibeş hastanın doku blokları incelendiğinde 17 hastada in situ komponent, 8 hastada çevre meme dokusu komponenti bulunmuyordu. Doku bloğunda normal çevre dokusu bulunan 17 hastanın 15' i (%88) PTEN pozitif iken, invaziv tümör komponenti olan 25 hastanın 6' sında (%24) PTEN pozitifliği saptandı. İn situ komponenti olan 8 hastanın ise 4' ü (%50) PTEN pozitif. Normal çevre meme dokusu ile in situ tümör komponentindeki PTEN ekspresyonu arasında pozitif, çevre dokusu ile invaziv tümör komponentindeki PTEN ekspresyonu arasında ise negatif korelasyon saptandı. İnvaziv tümör komponenti PTEN negatif saptanan ve yeterli çevre meme dokusu bulunan 19 hastanın 16' sında çevre meme dokusu PTEN pozitif. Normal meme dokusundan invaziv tümör komponentine doğru PTEN ekspresyonunda azalma görülmesi, PTEN kaybının hastalığın erken döneminde değil invaziv tümör gelişimi aşamasında geliştiği hipotezini destekliyor olabilir (193). İnvaziv tümör, in situ tümör ve çevre meme dokusunda p27 ve PI3K ekspresyonu açısından farklılık bulunmadı.

Çalışmamızda PTEN ve p27 arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu, PTEN ile PI3K ve p27 ile PI3K arasında ise ilişki saptanmadı. HER2 ekspresyonu ile p27 proteini arasında ise ters orantılı bir ilişki mevcuttur (190). Newman ve arkadaşlarının çalışmasında HER2 pozitif meme kanserli 20 hastanın tümünde p27 ekspresyonu düşük olarak bulunmuştur (194). Bizim çalışmamızda da 25 hastanın 20' sinde (%80) p27 ekspresyonu düşük bulundu. Meme kanseri hücrelerinde eksojen PTEN eklenmesi ile p27 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (195). PTEN' in PI3K/Akt yolunu

negatif düzenlediği ve p27 yıkımını azalttığı düşünülürse, p27 ekspresyonu ile arasında doğrusal ilişki olması beklenen bir bulgudur. Bu ilişkiyi inceleyen iki çalışmadan Tsutsui ve arkadaşlarının çalışmasında PTEN ve p27 arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir ve her iki proteinin düşük oranda eksprese edilmesinin kötü prognostik faktör ve agresif seyirle ilişkili olduğu bildirilmiştir (195). Engin ve arkadaşlarının çalışmasında ise PTEN ve p27 arasında ilişki bulunmamıştır (196).

PTEN ve PI3K arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda yayın mevcuttur, ancak sonuçlar çelişkilidir. Saal ve arkadaşları PTEN eksikliği ve PI3K aktive edici mutasyonların nadiren birlikte görüldüğünü bildirmiş, PI3K mutasyonu bulunan olguların genellikle PTEN pozitif olduğunu belirtmişlerdir ve PI3K/Akt aktivasyonu için başka faktörlerin de (p-Akt gibi) devreye girmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir (32). Berns ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer sonuçlar alınmıştır (131). Buna karşın Tenorio ve arkadaşları PTEN kaybının PI3K aktive edici mutasyonlarıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (126). PTEN ve PI3K ekspresyonunun değerlendirildiği iki çalışmada ise bu 2 parametre arasında ilişki tespit edilmemiştir (134,197).

Literatürde aktive edici PI3K mutasyonlarının meme kanserinde sık görüldüğünü bildiren çok sayıda yayın bulunmasına karşın, PI3K ekspresyonu durumuna dair bilgiler kısıtlıdır. Song ve arkadaşlarının 212 hastayı içeren çalışmalarında PI3K ekspresyonu oranı %66 olarak bulunmuştur (197); buna karşın aynı çalışmada HER2 durumu ayrı olarak değerlendirildiğinde, HER2 pozitif bulunan 26 hastanın 21' inde (%81) PI3K ekspresyonu saptanmıştır. Fabi ve arkadaşlarının çalışmasında ise HER2 pozitif 73 hastanın 34' ünde (%46) PI3K ekspresyonu tespit edilmiştir (134). Bizim çalışmamızda ise 25 hastanın 24' ünde (%96) PI3K pozitifliği bulundu; bu sonuç Song ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumluydu. Bulgular HER2 pozitif meme kanserinde PI3K yolunun aktif olduğunu göstermektedir.

Metastatik meme kanserinde standart tedaviye trastuzumab eklenmesinin sağkalımı iyileştirdiğini bildiren diğer çalışmalarla uyumlu olarak (81,82), çalışmamızda trastuzumab içeren tedaviye yanıt veren hasta grubunda medyan genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım süreleri tedaviye yanıt veremeyen hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha uzun bulundu. Tedaviye yanıt ile PTEN, p27 ve PI3K arasındaki ilişki incelendiğinde; PTEN ekspresyonu ile tedavi yanıtı arasında sınırdaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir ilişki saptandı ($p=0.086$). Trastuzumab içeren tedaviye yanıt vermeyen 7 hastanın hepsinde PTEN negatifliği mevcuttu. PTEN pozitif bulunan 6 hastanın tümü trastuzumab içeren tedaviye yanıt vermişti; buna karşın PTEN negatif bulunan 19 hastanın 12' sinde trastuzumaba yanıt mevcuttu. Yapılan çalışmalarda PI3K/Akt yolunun elemanlarının trastuzumab yanıtını predikte edip etmediğiyle ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. Berns, Esteva ve Dave' in çalışmalarında PTEN ekspresyonu ve PI3K aktive edici mutasyon durumunun tek başına trastuzumab yanıtını değerlendirmek için yetersiz olduğu, ancak beraber değerlendirildikleri takdirde (PTEN kaybı ve/veya PI3K mutasyonu varlığı) prediktif olduğu bildirilmiştir (131,132,135). Fabi ve arkadaşları benzer şekilde tek başına PTEN ekspresyonunun prediktif olmadığını, ancak p-Akt ile beraber değerlendirildiğinde trastuzumabdan fayda görmesi olası hastaları belirleyebileceğini önce sürmüşlerdir (134). Ancak Gori ve arkadaşları metastatik zeminde (133), Yonemori ve arkadaşları ise neoadjuvan olarak uygulanan trastuzumab içeren tedaviye yanıt açısından PTEN ve Akt' ın prediktif olmadığını bildirmişlerdir (136). Çalışmaların vardığı sonuçlardaki farklılıkların birkaç nedeni vardır. İlki; daha önce alınan tedavilerin PTEN ekspresyonunu etkileme olasılığıdır. Bir diğer önemli nokta ise trastuzumaba yanıtın değerlendirilmesidir. Bütün klinik çalışmalarda değerlendirme kriteri olarak RECIST kullanılmıştır ve çoğu hasta trastuzumabla eş zamanlı olarak kemoterapi almaktadır.

Bazı çalışmalarda sadece tam ve parsiyel yanıt veren hastalar “trastuzumab içeren tedaviye yanıtlı” kapsamına alınırken, kimi çalışmalarda stabil hastalık da aynı kategori içerisinde değerlendirilmiştir. RECIST’ le değerlendirilen “yanıt”, PTEN ekspresyonuna göre trastuzumab içeren tedavilere duyarlılığı değerlendirmek açısından iyi bir ölçüt olmayabilir, çünkü eşzamanlı olarak kullanılan kemoterapi trastuzumab yanıtını değerlendirmede PTEN pozitifliğinin gerçek etkisini maskeleyebilir. Teorik olarak trastuzumaba daha duyarlı olan PTEN pozitif hastalar kemoterapiye dirençli olabilirler ve trastuzumab içeren kemoterapiye yanıtızsız olarak değerlendirilebilirler. Kullanılan kemoterapi ajanının türü de tedavi yanıtını etkileyebilir. HER2 pozitif meme tümörleri antrasiklin ve taksan içeren tedavilere daha iyi yanıt vermektedir (198,199).

Nahta ve arkadaşlarının prelinik çalışmasında düşük p27 ekspresyonunun trastuzumab direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (159). Daha sonra bu sonucu doğrulayan bir çok deneysel çalışma yayınlanmasına karşın literatürde p27 ekspresyonu ile trastuzumab yanıtını karşılaştıran klinik çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda trastuzumab içeren tedaviye yanıt veren 5 hastanın 1’ inde, trastuzumaba yanıt vermeyen 20 hastanın ise 6’ sında p27 ekspresyonu düşük saptandı; buna karşın trastuzumaba yanıt vermeyen 7 hastanın 6’ sında p27 ekspresyonu negatifti. Trastuzumab içeren tedaviye yanıt ile p27 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

Çalışmamızda tümör çapı (T evresi) ile PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulundu, diğer tümör karakteristikleri ile (grad, lenfatik invazyon, vasküler invazyon, lenf bezi metastazı, HR durumu ve uzak metastaz durumu) ilişki saptanmadı. Literatürde PTEN ve PI3K ile tümör karakteristikleri arasındaki ilişkiye dair farklı sonuçlar mevcuttur. Tenorio ve arkadaşları PTEN negatif ve/veya PI3K mutasyonu bulunan vakaların genellikle küçük çaplı tümörler olduğunu bildirmişler,

bunun tümördeki yüksek proliferasyon hızı nedeniyle artan ve karşılanamayan oksijen ve metabolik ihtiyaçlardan kaynaklanan hücre ölümüyle veya PI3K aktivasyonuna bağlı hücre ölümüyle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (126). Ancak Chung, Shoman ve Depowski' nin çalışmalarında PTEN ekspresyonu ile tümör çapı arasında ilişki bulunmamıştır (127,128,130). Li ve arkadaşları ise PI3K mutasyonu ile tümör çapı arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir (138). HER2 pozitif hastaları içeren ve son zamanlarda yayınlanan 2 çalışmada ise PTEN, PI3K mutasyonu ve ekspresyonu ile tümör karakteristikleri arasında bir ilişki saptanamamıştır (132,134). Bir çok çalışmada PTEN negatifliği ve PI3K mutasyonu ile lenf bezi metastazı arasında güçlü ilişki olduğu ve bu moleküler özellikleri taşıyan tümörlerin agresif seyrettiği belirtilmiştir (32,127,128,130,195). Ancak Fabi ve Esteve, HER2 pozitif meme kanserli hastalarda böyle bir ilişki tespit edememişlerdir (132,134). Bizim çalışmamızda PTEN pozitif olan 6 hastanın 2' sinde T1 tümör ve 2' sinde de T2 tümör mevcuttu, T3 tümör yoktu ve 2 hastanın tümör çapı bilinmiyordu. PTEN negatif olan 19 hastanın ise 7' sinde T1, 9' unda T2 tümör mevcuttu, 1 hastanın tümör çapı bilinmiyordu. T3 tümörü olan her iki hasta da PTEN negatifti. PI3K mutasyonu ile tümör çapı ilişkisine bakıldığında, aradaki ilişki anlamlı olmasına karşın vakaların tamamına yakını PI3K pozitif olduğundan istatistiksel açıdan PI3K negatif ve pozitifliğinin tümör çapına etkisini değerlendirmek güçleşmektedir. PI3K pozitif olan 24 vakanın 8' i T1, 11' i T2 ve 2' si de T3 tümördü, 3 vakanın ise tümör çapı bilinmiyordu.

Tsutsui ve arkadaşları düşük p27 ekspresyonunun yüksek grad ve ER negatifliği ile (195), Spataro ve arkadaşları ise yüksek grad ve HER2 aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (190). Buna karşın Engin ve arkadaşlarının çalışmasında p27 ile tümör çapı, grade, lenf bezi metastazı ve hormon reseptör durumu arasında ilişki bulunmamıştır (196). Bizim çalışmamızda p27 ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki

bulundu, diğerk tümör karakteristikleri ile ilişki saptanmadı. P27 negatif olan 20 vakanın 7' sinde T1, 9' unda T2 ve 2' sinde T3 tümör mevcuttu, 2 vakanın ise tümör çapı bilinmiyordu.

HR durumu, PTEN ve PI3K arasındaki ilişki bir başka ilgi çekici konudur. Shoman ve arkadaşları PTEN kaybı ile ER pozitifliği arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (130). Tenorio ve arkadaşları PTEN kaybı ve PI3K mutasyonu ile ER pozitifliği arasında pozitif korelasyon bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (126). Saal ve arkadaşları PTEN pozitifliği ve PI3K mutasyonu ile ER ve PR pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir; ayrıca hastaları ER pozitif/PR pozitif ve ER negatif/PR negatif olarak 2 gruba klasifiye ederek incelediklerinde ER pozitif/PR pozitif tümörlerin genellikle PI3K mutasyonu pozitif, ER negatif/PR negatif tümörlerin ise genellikle PTEN negatif olduğunu belirtmişlerdir ve bu durumun HR pozitif ve negatif tümörler arasındaki patogeneze ve biyolojiye ait farklılığı yansıttığını ileri sürmüşlerdir (32). Bir çalışmada ise adjuvan tamoksifenle tedavi edilen ER pozitif erken evre meme kanserli hastalarda düşük PTEN ekspresyonunun kısa TTR ile ilişkili olduğu ve tamoksifen tedavisi başarısızlığını predikte ettiği bildirilmiştir (130). Bizim çalışmamızda HR pozitif ve negatif hastalar karşılaştırılığında, PTEN, PI3K ve p27 açısından anlamlı farklılık saptanmadı. HR pozitif 17 hastanın 11' inde PTEN kaybı saptandı, buna karşın HR negatif olan 8 hastanın tümü PTEN negatifti. Benzer şekilde bu 8 hastanın 7' sinde p27 ekspresyonu da negatif bulundu. Hastalar ER ve PR durumuna göre 4 gruba ayrılarak incelendiğinde p27 ve PI3K açısından ilişki bulunmadı; PTEN' le ilişkisi açısından incelendiğinde ise sınırda bir anlamlılık saptandı ($p=0.051$). ER pozitif/PR pozitif olan 7 hastanın 3' ünde PTEN negatifti; ER negatif/PR negatif bulunan 8 hastanın ise tümü PTEN negatifti. P27 ekspresyonu temelinde değerlendirildiğinde ise PTEN ekspresyonu ile paralel şekilde ER negatif/PR negatif

bulunan 8 hastanın 7' sinde p27 eksikliği mevcuttu. Sonuçlarımız ER negatif/PR negatif/HER2 pozitif meme kanserinde PTEN kaybının ve düşük p27 ekspresyonun sık görüldüğünü göstermektedir. HER2 pozitif hastalardaki diğer çalışmalarda ise HR durumu ile PTEN ve PI3K arasında ilişki saptanmamıştır (132,134).

PTEN, p27 ve PI3K' in meme kanserinde prognostik değeri olup olmadığı günümüzde tartışma konusudur. Çalışma grubumuzun sağkalım sonuçları ile PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu arasındaki ilişki incelendiğinde PTEN ve p27 ekspresyonu negatif bulunan hastaların medyan OS ve TTP değerlerinin daha kısa olduğu gözlemlendi, ancak aradaki fark istatistiksel anlamlılığa erişmiyordu. Çalışma grubumuzun tamamına yakınında PI3K ekspresyonu pozitif bulunduğundan istatistiksel açıdan PI3K ekspresyonunun sağkalıma etkisini değerlendirmek zordur. Li ve Depowski' nin çalışmalarında PTEN kaybı ve PI3K mutasyonunun kısa OS ve PFS ile beraber olduğu ve kötü prognostik faktörler oldukları bildirilmiştir (128,138). Tenorio ve Berns ise PTEN ve PI3K ile OS ve TTP arasında herhangi bir ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir (126,131). HER 2 pozitif hastaları içeren bir çalışmada PTEN kaybı ile TTP ve OS arasında ilişki bulunmamıştır (133). Esteva ve arkadaşlarının literatürdeki en fazla hasta sayısına sahip olan ve HER2 pozitif metastatik meme kanserli 137 hastayı içeren çalışmalarında ise, gerek tek başlarına gerek kombine olarak değerlendirildiğinde PTEN kaybı ve PI3K mutasyonunun kısalmış OS' la beraber olduğu görülmüştür (132). Fabi ve arkadaşları PTEN ve PI3K' in kombine değerlendirildiği takdirde, PTEN pozitif/PI3K pozitif fenotipin uzun PFS ile ilişkili olduğunu, OS' a ise etkisi olmadığını belirtmişlerdir (134). P27 ekspresyonunun sağkalıma etkisini inceleyen 2 çalışmadan birinde OS ve PFS ile ilişki saptanmazken (196), diğer çalışmada düşük p27 ekspresyonunun PTEN kaybıyla beraber değerlendirildiği takdirde kısa hastaliksız sağkalımı predikte ettiği bildirilmiştir (195). Bizim çalışmamızın sonuçları literatürde

PTEN kaybı ve düşük p27 ekspresyonunun sağkalımı predikte ettiğini bildiren çalışmalarla uyumludur, ancak muhtemelen hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel anlamlılığa ulaşmamaktadır.

Vaka sayımızın az olması çalışmanın sonuçlarının istatistiksel yorumunu güçleştirse de, çalışmamız PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonunun HER2 pozitif metastatik meme kanserinde trastuzumab yanıtını ve kısalmış sağkalımı predikte ettiğini destekler niteliktedir. HER2 pozitif meme kanseri biyolojik olarak diğer meme kanseri alttiplerinden farklı özelliklere sahiptir. Çalışmamızda PTEN kaybı, düşük p27 ekspresyonu ve pozitif PI3K ekspresyonu HER2 meme kanserinde sık görülen bulgular olarak göze çarpmaktadır ve literatürde sporadik meme kanserinde bildirilenden daha yüksek sıklıkta bulunmuştur. Sonuçlarımız PI3K/Akt yolunun HER2 pozitif meme kanserinde aktif olduğunu göstermektedir. Hastalığın gelişiminde ve progresyonunda yer alan sinyal ileti yolları arasındaki ilişkilerin ve bu yollardaki moleküllerle ilgili özelliklerin daha iyi bilinmesi mevcut hedef moleküllere yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine öncülük edecektir.

ÖZET

GİRİŞ: PTEN, HER2 aşırı ekspresyonu olan meme kanserinde trastuzumab duyarlılığını etkileyen en önemli düzenleyicidir. PI3K/Akt yolu aktivasyonunun HER2 pozitif metastatik meme kanserinde trastuzumab tedavisine direnç ve kötü prognozla ilişkili olduğuna dair bulgular mevcuttur. Bu çalışmada HER2 pozitif metastatik meme kanserinde PTEN ve PI3K/Akt yolunun diğer komponentlerinden PI3K ve p27 ekspresyonunun prediktif ve prognostik önemi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamıza İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilimdalı'nda takip edilen ve meme dokusu örnekleri Patoloji Anabilimdalı tarafından incelenerek histolojik olarak tanısı konmuş, HER2 pozitif metastatik meme kanseri olan ve birinci basamakta trastuzumab içeren tedavi alan 25 hasta dahil edildi. Hastaların mevcut meme dokusu bloklarında bulunan invaziv tümör, in situ tümör ve çevre normal meme dokusu komponentlerinde IHK yöntemi kullanılarak saptanan PTEN, PI3K ve p27 ekspresyonu ile tümör karakteristikleri, tedavi yanıtı, ilk meme kanseri tanısı tarihinden (OS1), metastatik hastalık tanısı tarihinden (OS2) ve trastuzumab içeren tedavinin başlandığı tarihten itibaren değerlendirilen genel sağkalım, progresyona kadar geçen süre (TTP) ve rekürrense kadar geçen süre (TTR) arasındaki ilişki araştırıldı.

BULGULAR: Hastaların %76' sında (n=19) PTEN ekspresyonu negatif ve %80' inde (n=20) p27 ekspresyonu negatif saptandı, 24 hastada (%96) PI3K ekspresyonu pozitif bulundu. İn situ PTEN ile çevre meme dokusu PTEN ekspresyonu arasında pozitif, invaziv PTEN ile çevre meme dokusu PTEN ekspresyonu arasında ise negatif korelasyon tespit edildi (p değerleri sırasıyla 0.036 ve 0.042). İnvaziv tümör komponentindeki PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonunun kendi aralarındaki ilişkisi incelendiğinde; PTEN ile p27 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu (p=0.036). Trastuzumaba yanıtı ve yanıtı olmayan hastalar PTEN, p27 ve PI3K

ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulunmadı. Tümör karakteristikleri açısından incelendiğinde PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki bulundu (p değerleri sırasıyla 0.009, 0.003 ve <0.001); tümör gradı, lenfatik invazyon, vasküler invazyon, lenf bezi metastazı ve uzak metastaz durumu ile ilişki saptanmadı. OS1 ve TTP, trastuzumab içeren tedaviye yanıtı hastalarda yanıt vermeyen hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak uzundu (p değerleri sırasıyla 0.016 ve 0.006). İnvaziv tümör komponentindeki PTEN, p27 ve PI3K ekspresyonu pozitifliği ve negatifliği arasında trastuzumab yanıtı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. PTEN kaybı olan hastalarda daha kısa OS1, OS2, OS3, TTP ve TTR olduğuna dair bir trend izleniyordu, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Benzer trend p27 negatif olan hastalarda OS1, OS2, OS3 ve TTR açısından saptandı. PI3K ekspresyonu ve tümör karakteristikleri ile OS, TTP ve TTR arasında ilişki saptanmadı.

SONUÇ: Çalışmamızda PTEN kaybı, düşük p27 ekspresyonu ve pozitif PI3K ekspresyonu HER2 meme kanserinde sık görülen bulgular olarak göze çarpmaktadır ve literatürde sporadik meme kanserinde bildirilenden daha yüksek sıklıkta bulunmuştur. Vaka sayımızın az olması çalışmanın sonuçlarının istatistiksel yorumunu güçleştirse de, çalışmamız PTEN ve p27 ekspresyonunun HER2 pozitif metastatik meme kanserinde trastuzumab yanıtını ve kısalmış sağkalımı predikte ettiğini destekler niteliktedir. Sonuçlarımız PI3K/Akt yolunun HER2 pozitif meme kanserinde aktif olduğunu göstermektedir.

SUMMARY

INTRODUCTION: PTEN is the key regulator for sensitivity to trastuzumab therapy in HER2 overexpressing breast cancer. There are data indicating the activation of PI3K/Akt pathway is associated with poor prognosis and resistance to trastuzumab therapy in HER2 positive metastatic breast cancer. In this study the predictive and prognostic significance of PTEN and expression of PI3K and p27 which are components of the PI3K/Akt signaling pathway in HER2 positive metastatic breast cancer was assessed.

MATERIAL AND METHODS: 25 patients who carried a diagnosis of metastatic HER2 positive breast carcinoma and who have attended Istanbul Bilim University Medical Oncology Clinic were recruited for the study group. All of the patients breast tissue samples were examined by the institution's pathology department. All patients in the study group received trastuzumab based therapies as their first line treatment. Invasive tumor, in situ tumor and surrounding normal mammary tissue components from all of the patients breast tissue blocks were evaluated for PTEN, PI3K and p27 expression by immunohistochemistry and their correlations with tumor characteristics, response to treatment, overall survival from the date of diagnosis of breast cancer (OS1), from the date of recognition of metastatic disease (OS2) and from the starting date of trastuzumab containing therapy (OS3), time to progression (TTP) and time to recurrence (TTR) were analyzed .

RESULTS : In 76 % (n=19) of the patient group PTEN expression and in 80% (n=20) p27 expression was found to be negative. In 24 subjects (96%) PI3K expression was reported as positive. A positive correlation between in situ cancer and surrounding normal mammary tissue PTEN expression was found while the correlation between invasive cancer and surrounding normal mammary tissue PTEN expression was

negative (p values 0.036 and 0.042, respectively). When the correlation between PTEN, p27 and PI3K expression in invasive cancer tissue with each other was analyzed it was found that there was a positive statistically significant correlation between PTEN and p27 expression (p=0.036). When the group of patients who respond to trastuzumab treatment was compared to the group who did not respond to treatment with trastuzumab, there was no statistically significant association found for expression of PTEN, p27 and PI3K. When the same comparison was made for tumor characteristics a significant relation was found between tumor size and PTEN, p27 and PI3K expression (p values 0.009, 0.003 and <0.001, respectively); but a statistically significant relation between expression of the above stated expression of the genes and tumor grade, lymphatic invasion, vascular invasion, and presence of distant metastasis was not found to be present. OS1 and TTP was significantly longer in the patient group who responded to trastuzumab based treatment compared to the group who was unresponsive to the treatment (p values 0.016 and 0.006, respectively). Although the status of PTEN, p27 and PI3K expression in the invasive tumor tissue was not found to be significantly correlated with response to trastuzumab treatment a trend towards lower OS1, OS2, OS3, TTP and TTR in patients with loss of PTEN expression which did not reach a statistical significance was observed. A similar trend for lower OS1, OS2, OS3 and TTR in patients whose invasive breast tissues did not express p27 was also found. A relation between PI3K expression and tumor characteristics with OS, TTP and TTR was not found .

CONCLUSION: Loss of expression of PTEN, low expression of p27 and positive PI3K expression was found to be frequent in HER2 positive breast cancer. Their frequency was higher when compared to frequency of expression in sporadic breast cancer reported in the literature. Although the small number of our study group has

made statistical interpretation of the results difficult, we propose the results of our study support the view that the presence of PTEN and p27 expression in HER2 positive metastatic breast cancer predicts response to trastuzumab treatment and shortened overall survival. Our results indicate that PI3K/Akt signaling pathway is active in HER2 overexpressing breast cancer.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:000–000.
2. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 2004-2006 Yılları Türkiye Kanser İnsidansı. www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf.
3. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;17;288:321-33.
4. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007;356:1670-4.
5. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 2010;304:1684-92.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005;5:74-108.
7. Abeloff MD, Antonio CW, Weber BL, Tal ZZ, Sacchini V, McCormick B. Cancer of the Breast. Abeloff' s Clinical Oncology (ed: Abeloff MD), 4th edition,2008:1876-7.
8. Cordera F, Jordan VC. Steroid receptors and their role in the biology and control of breast cancer growth. *Semin Oncol* 2006;33:631-41.
9. Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56 Suppl 1:21-6.

10. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2004;10:331S-6S.
11. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1254-61.
12. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:7721-35.
13. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;9:142-53.
14. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Howell T, Houghton J, Baum M. Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *J Clin Oncol* 2005;23:7512-7.
15. Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C,. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol* 2008;26:1059-65.
16. Clemens M, Kaufman B, Mackey JR, Bapsy P, Vaid A, Wardley A, et al. Trastuzumab plus anastrozole may prolong overall survival in postmenopausal women with HER2-positive, hormone-dependent metastatic breast cancer: Results

of a post-hoc analysis from the TAnDEM study. 2007 Breast Cancer Symposium, Abstract No:231.

17. Mosesson Y, Yarden Y. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol* 2004;14:262-70.
18. Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005;36:250-61.
19. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-45.
20. Daniele L, Sapino A. Anti-HER2 treatment and breast cancer: state of the art, recent patents, and new strategies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009;4:9-18.
21. Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5838-47.
22. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733-43.
23. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1852-7.

24. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117-27.
25. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:628-38.
26. Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol* 1;24:2428-36.
27. Tseng PH, Wang YC, Weng SC, Weng JR, Chen CS, Brueggemeier RW, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol Pharmacol* 2006;70:1534-41.
28. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004;3:772-5.
29. Eng C, Peacocke M. PTEN and inherited hamartoma-cancer syndromes. *Nat Genet* 1998 ;19:223.
30. García JM, Silva J, Peña C, Garcia V, Rodríguez R, Cruz MA, et al. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;41:117-24.

31. Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, et al. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 2005;7:193-204.
32. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2554-9.
33. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ;100:8418-23.
34. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009 ;20:628-35.
35. Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010;7:e1000279.
36. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68.
37. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 2006;10:529-41.

38. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
39. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
40. MINDACT (Microarray In Node-negative Disease May Avoid Chemotherapy): A Prospective, Randomized Study Comparing the 70-Gene Signature With the Common Clinical-Pathological Criteria in Selecting Patients for Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer With 0 to 3 Positive Nodes. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00433589>.
41. Program for the Assessment of Clinical Cancer Tests (PACCT-1): Trial Assigning Individualized Options for Treatment: The TAILORx Trial. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00310180>.
42. Daniele L, Sapino A. Anti-HER2 treatment and breast cancer: state of the art, recent patents, and new strategies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009;4:9-18.
43. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009;14:320-68.
44. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:18-43.

45. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:751-9.
46. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway - Beyond Rapalogs. *Oncotarget* 2010;1:530-43.
47. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
48. Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 2006;8:215.
49. Drebin JA, Link VC, Stern DF, Weinberg RA, Greene MI. Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 1985;41:697-706.
50. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;9:1165-72.
51. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 2004;10:5650-5.
52. Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1:S35-41.

53. Kumar R, Shepard HM, Mendelsohn J. Regulation of phosphorylation of the c-erbB-2/HER2 gene product by a monoclonal antibody and serum growth factor(s) in human mammary carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1991;11:979-86.
54. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999;26 (4 Suppl 12):60-70.
55. Bedard PL, de Azambuja E, Cardoso F. Beyond trastuzumab: overcoming resistance to targeted HER-2 therapy in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:148-62.
56. Molina MA, Sáez R, Ramsey EE, Garcia-Barchino MJ, Rojo F, Evans AJ, et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:347-53.
57. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:737-44.
58. Lennon S, Barton C, Banken L, Gianni L, Marty M, Baselga J, et al. Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1685-93.
59. Zhang Q, Tian L, Mansouri A, Korapati AL, Johnson TJ, Claret FX. Inducible expression of a degradation-resistant form of p27Kip1 causes growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *FEBS Lett* 2005;579:3932-40.

60. Newman L, Xia W, Yang HY, Sahin A, Bondy M, Lukmanji F, et al. Correlation of p27 protein expression with HER-2/neu expression in breast cancer. *Mol Carcinog* 2001;30:169-75.
61. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, et al. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 2004;6:661-72.
62. Alkarain A, Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:13-21.
63. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:269-80.
64. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother*. 1993;37:255-63.
65. Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 1999;27:1533-41.
66. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6:443-6.
67. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006;94:259-67.
68. Niculescu F, Rus HG, Retegan M, Vlaicu R. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am J Pathol* 1992;140:1039-43.

69. Jurianz K, Maslak S, Garcia-Schüler H, Fishelson Z, Kirschfink M. Neutralization of complement regulatory proteins augments lysis of breast carcinoma cells targeted with rhumAb anti-HER2. *Immunopharmacology* 1999;42:209-18.
70. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002;416:279-80.
71. Klos KS, Zhou X, Lee S, Zhang L, Yang W, Nagata Y, et al. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. *Cancer* 2003;98:1377-85.
72. Ordonez J, Gomez Martin CG, Cortes-Funes H. Trastuzumab in combination with bevacizumab in advanced breast cancer patient resistant to chemotherapy. *J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)* 2006;24:10762.
73. Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999;18:2241-51.
74. Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 1998;17:2235-49.
75. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, Wongvipat PN, Lee HJ, Slamon DJ. Monoclonal antibody to HER-2/neureceptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 1999;59:1347-55.
76. Söderlund K, Pérez-Tenorio G, Stål O. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2005;26:25-32.

77. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.
78. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-26.
79. Baselga J, Carbonell X, Castañeda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005;23:2162-71.
80. Seidman AD, Berry D, Cirincione C, Harris L, Muss H, Marcom PK, et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. *J Clin Oncol* 2008;26:1642-9.
81. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
82. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-74.

83. Bontenbal M, Seynaeve C, Stouthard J, Bos M, Braun H, Erdkamp FL, et al. Randomized study comparing efficacy/toxicity of monotherapy trastuzumab followed by monotherapy docetaxel at progression, and combination trastuzumab/docetaxel as first-line chemotherapy in HER2-neu positive, metastatic breast cancer (MBC) (HERTAX study). *J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. 2008;26:1014.
84. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001;19:2587-95.
85. Leyland-Jones B, Gelmon K, Ayoub JP, Arnold A, Verma S, Dias R, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J Clin Oncol* 2003;21:3965-71.
86. Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, Belt R, Ilegbodun D, Loesch D, et al. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:2786-92.
87. Valero V, Forbes J, Pegram MD, Pienkowski T, Eiermann W, von Minckwitz G, et al. Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with HER2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens. *J Clin Oncol* 2011;29:149-56.
88. Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:865-70.

89. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:926-35.
90. Witters LM, Kumar R, Chinchilli VM, Lipton A. Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:1-5.
91. Kunisue H, Kurebayashi J, Otsuki T, Tang CK, Kurosumi M, Yamamoto S, et al. Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br J Cancer* 2000;82:46-51.
92. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A, et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol* 2009;27:5529-37.
93. Marcom PK, Isaacs C, Harris L, Wong ZW, Kommarreddy A, Novielli N, et al. The combination of letrozole and trastuzumab as first or second-line biological therapy produces durable responses in a subset of HER2 positive and ER positive advanced breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:43-9.
94. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84.
95. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J, Davidson NE, Geyer CE, et al. Updated results of the combined analysis of NCCTG N9831 and NSABP B-31 adjuvant chemotherapy with/without trastuzumab in patients with HER2-positive

- breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 512.
96. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al.. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-72.
 97. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369:29-36.
 98. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC->T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC->TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in Her2neu positive early breast cancer patients: BCIRG 006 2nd interim analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;100:S63 (52a).
 99. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;354:809-20.
 100. Joensuu H, Bono P, Kataja V, Alanko T, Kokko R, Asola R, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol* 2009;27:5685-92.
 101. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):39-51.
 102. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, Geyer CE Jr, Ewer M, Keefe D, et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin

- and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005;23:7811-9.
103. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Sledge GW, Kaufman PA, Hudis CA, et al. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J Clin Oncol* 2008;26:1231-8.
104. Rastogi P, Jeong J, Geyer CE, Costantino JP, Romond EH, Ewer MS, et al. Five year update of cardiac dysfunction on NSABP B-31, a randomized trial of sequential doxorubicin/cyclophosphamide (AC)→paclitaxel (T) vs. AC→T with trastuzumab (H). *J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)* 2007;25:LBA513.
105. Telli ML, Hunt SA, Carlson RW, Guardino AE. Trastuzumab-related cardiotoxicity: calling into question the concept of reversibility. *J Clin Oncol* 2007;25:3525-33.
106. Ewer MS, Lippman SM. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J Clin Oncol* 2005;23:2900-2.
107. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, DeFendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007;7:153.
108. Bria E, Cuppone F, Fornier M, Nisticò C, Carlini P, Milella M, et al. Cardiotoxicity and incidence of brain metastases after adjuvant trastuzumab for early breast cancer: the dark side of the moon? A meta-analysis of the randomized trials. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:231-9.

109. Brufsky A. Trastuzumab-based therapy for patients with HER2-positive breast cancer: from early scientific development to foundation of care. *Am J Clin Oncol* 2010;33:186-95.
110. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, Saha A, Diedrich G, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010;16:4226-35.
111. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, et al. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1124-30.
112. Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, Arango M, Rudland PS, Yee L et al. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* 2002;99:783-91.
113. Carraway KL 3rd, Rossi EA, Komatsu M, Price-Schiavi SA, Huang D, Guy PM, et al. An intramembrane modulator of the ErbB2 receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signaling. *J Biol Chem* 1999;274:5263-6.
114. Moniaux N, Nollet S, Porchet N, Degand P, Laine A, Aubert JP. Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin. *Biochem J* 1999;338:325-33.
115. Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, et al. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not

- activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene* 2002;21:7524-32.
116. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005;65:473-82.
117. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241-319.
118. Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol* 2009;86:95-100.
119. Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 2005;65:6755-63.
120. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005;280:8875-83.
121. Pályi-Krekk Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szöllosi J, Nagy P. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* 2007;43:2423-33.
122. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003;22:183-98.
123. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15:356-62.
124. Chen ST, Yu SY, Tsai M, Yeh KT, Wang JC, Kao MC, et al. Mutation analysis of the putative tumor suppression gene PTEN/MMAC1 in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55:85-9.

125. Rhei E, Kang L, Bogomolnii F, Federici MG, Borgen PI, Boyd J. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:3657-9.
126. Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:3577-84.
127. Chung MJ, Jung SH, Lee BJ, Kang MJ, Lee DG. Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer. *Pathol Int* 2004;54:10-5.
128. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001;14:672-6.
129. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627-44.
130. Shoman N, Klassen S, McFadden A, Bickis MG, Torlakovic E, Chibbar R. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Mod Pathol* 2005;18:250-9.
131. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007;12:395-402.
132. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 2010;177:1647-56.

133. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, Stocchi L et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol* 2009;20:648-54.
134. Fabi A, Metro G, Di Benedetto A, Nisticò C, Vici P, Melucci E, et al. Clinical significance of PTEN and p-Akt co-expression in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Oncology* 2010;78:141-9.
135. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol* 2011;29:166-73.
136. Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hashizume K, Ono M, et al. Immunohistochemical expression of PTEN and phosphorylated Akt are not correlated with clinical outcome in breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neo-adjuvant chemotherapy. *Med Oncol* 2009;26:344-9.
137. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94:247-52.
138. Li SY, Rong M, Grier F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96:91-5.
139. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, et al. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13:6064-9.

140. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearlman RV, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2005;65:10992-11000.
141. Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci* 2011;102:1-8.
142. Dunlap J, Le C, Shukla A, Patterson J, Presnell A, Heinrich MC, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:409-18.
143. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:6084-91.
144. She QB, Chandralapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, et al. Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* 2008;3:e3065.
145. Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab (Herceptin)-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) and epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91:187-201.
146. Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 2007;13:4909-19.
147. Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Mihalic NJ. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2009;69:2191-4.

148. Arteaga CL, O'Neill A, Moulder SL, Pins M, Sparano JA, Sledge GW, et al. A phase I-II study of combined blockade of the ErbB receptor network with trastuzumab and gefitinib in patients with HER2 (ErbB2)-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6277-83.
149. Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008;68:5878-87.
150. Yao E, Zhou W, Lee-Hoeflich ST, Truong T, Haverty PM, Eastham-Anderson J, et al. Suppression of HER2/HER3-mediated growth of breast cancer cells with combinations of GDC-0941 PI3K inhibitor, trastuzumab, and pertuzumab. *Clin Cancer Res* 2009;15:4147-56.
151. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* 2009;69:9330-6.
152. A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Pertuzumab + Trastuzumab + Docetaxel vs. Placebo + Trastuzumab + Docetaxel in Previously Untreated Her2-Positive Metastatic Breast Cancer. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00567190>.
153. Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szöllosi J, Brockhoff G. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res* 2005;304:604-19.

154. Ebner R, Derynck R. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell Regul* 1991;2:599-612.
155. Alwan HA, van Zoelen EJ, van Leeuwen JE. Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J Biol Chem* 2003;278:35781-90.
156. Valabrega G, Montemurro F, Sarotto I, Petrelli A, Rubini P, Tacchetti C, et al. TGF alpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation. *Oncogene* 2005;24:3002-10.
157. Le XF, Pruefer F, Bast RC Jr. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. *Cell Cycle* 2005;4:87-95.
158. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 2002;62:4132-41.
159. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3981-6.
160. Cardoso F, Durbecq V, Laes JF, Badran B, Lagneaux L, Bex F, et al. Bortezomib (PS-341, Velcade) increases the efficacy of trastuzumab (Herceptin) in HER-2-positive breast cancer cells in a synergistic manner. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3042-51.
161. Fujita T, Doihara H, Washio K, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, et al. Proteasome inhibitor bortezomib increases PTEN expression and enhances

- trastuzumab-induced growth inhibition in trastuzumab-resistant cells. *Anticancer Drugs* 2006;17:455-62.
162. A Phase I, Open Label, Dose-Escalating Study of the Proteasome Inhibitor PS-341 in Combination With Two Schedules of Herceptin, in Patients With Advanced Breast Cancer That Overexpresses HER2. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00199212>.
163. Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum Pathol* 2003;34:803-8.
164. Peyrat JP, Bonnetterre J, Vennin PH, Jammes H, Beuscart R, Hecquet B, et al. Insulin-like growth factor 1 receptors (IGF1-R) and IGF1 in human breast tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37:823-7.
165. Peyrat JP, Bonnetterre J, Beuscart R, Djiane J, Demaille A. Insulin-like growth factor 1 receptors in human breast cancer and their relation to estradiol and progesterone receptors. *Cancer Res* 1988;48:6429-33.
166. Lu Y, Zi X, Pollak M. Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2004;108:334-41.
167. Köstler WJ, Hudelist G, Rabitsch W, Czerwenka K, Müller R, Singer CF, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression does not predict for resistance to trastuzumab-based treatment in patients with Her-2/neu overexpressing metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:9-18.
168. Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther* 2007;6:667-74.

169. Huang X, Gao L, Wang S, McManaman JL, Thor AD, Yang X, et al. Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-1 receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer Res* 2010;70:1204-14.
170. Esparís-Ogando A, Ocaña A, Rodríguez-Barrueco R, Ferreira L, Borges J, Pandiella A. Synergic antitumoral effect of an IGF-IR inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells. *Ann Oncol* 2008;19:1860-9.
171. Jerome L, Alami N, Belanger S, Page V, Yu Q, Paterson J, et al. Recombinant human insulin-like growth factor binding protein 3 inhibits growth of human epidermal growth factor receptor-2-overexpressing breast tumors and potentiates herceptin activity in vivo. *Cancer Res* 2006;66:7245-52.
172. Randomized Phase II Trial of Capecitabine and Lapatinib With or Without IMC-A12 in Patients With HER2 Positive Breast Cancer Previously Treated With Trastuzumab and an Anthracycline and/or a Taxane. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00684983>.
173. Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T, et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:1630-3.
174. Camp RL, Rimm EB, Rimm DL. Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 1999;86:2259-65.
175. Lindemann K, Resau J, Nährig J, Kort E, Leeser B, Annecke K, Welk A et al. Differential expression of c-Met, its ligand HGF/SF and HER2/neu in DCIS and adjacent normal breast tissue. *Histopathology* 2007;51:54-62.

176. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL 3rd, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:1471-7.
177. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.
178. Arya M, Ahmed H, Silhi N, Williamson M, Patel HR. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand-receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumour Biol* 2007;28:123-31.
179. Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 2004;6:459-69.
180. Tripathy D, Mukhopadhyay P, Verma U, et al. Targeting of the chemokine receptor CXCR4 in acquired trastuzumab resistance. [Abstract 306] *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106:S32.
181. Lavrovsky Y, Ivanenkov YA, Balakin KV, Medvedeva DA, Ivachtchenko AV. CXCR4 receptor as a promising target for oncolytic drugs. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:1075-87.
182. Huck L, Pontier SM, Zuo DM, Muller WJ. Beta1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15559-64.
183. Lesniak D, Xu Y, Deschenes J, Lai R, Thoms J, Murray D, Gosh S et al. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res* 2009;69:8620-8.

184. Mocanu MM, Fazekas Z, Petrás M, Nagy P, Sebestyén Z, Isola J, Tímár J et al. Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett* 2005;227:201-12.
185. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21:3940-7.
186. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1789-96.
187. Scaltriti M, Verma C, Guzman M, Jimenez J, Parra JL, Pedersen K, et al. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene* 2009;28:803-14.
188. Barok M, Isola J, Pályi-Krekk Z, Nagy P, Juhász I, Vereb G, et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2065-72.
189. Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, et al. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer* 1996;73:1233-6.
190. Spataro VJ, Litman H, Viale G, Maffini F, Masullo M, Golouh R, et al. Decreased immunoreactivity for p27 protein in patients with early-stage breast carcinoma is correlated with HER-2/neu overexpression and with benefit from one course of

- perioperative chemotherapy in patients with negative lymph node status: results from International Breast Cancer Study Group Trial V. *Cancer* 2003;97:1591-600.
191. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999;155:1253-60.
192. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol* 2002;33:405-9.
193. Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets* 2004;8:537-50.
194. Newman L, Xia W, Yang HY, Sahin A, Bondy M, Lukmanji F, et al. Correlation of p27 protein expression with HER-2/neu expression in breast cancer. *Mol Carcinog* 2001;30:169-75.
195. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, et al. Inactivation of PTEN is associated with a low p27Kip1 protein expression in breast carcinoma. *Cancer* 2005;104:2048-53.
196. Engin H, Baltali E, Güler N, Güler G, Tekuzman G, Uner A. Expression of PTEN, cyclin D1, P27/KIP1 in invasive ductal carcinomas of the breast and correlation with clinicopathological parameters. *Bull Cancer* 2006;93:21-6.
197. Song CH, Park SY, Eom KY, Kim JH, Kim SW, Kim JS, et al. Potential prognostic value of heat-shock protein 90 in the presence of phosphatidylinositol-3-kinase overexpression or loss of PTEN, in invasive breast cancers. *Breast Cancer Res* 2010;12:20.

198. Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, et al. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2002;8:1107-16.
199. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton S, Cowan D, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1496-506.