



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI

**İNSAN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ 2
POZİTİF METASTATİK MEME KANSERİ DOKU
ÖRNEKLERİNDE p95-HER2 EKSPRESYONUNUN PREDİKTİF
VE PROGNOSTİK ÖNEMİ**

Dr. MUHARREM KOÇAR
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2012



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI

İNSAN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ 2
POZİTİF METASTATİK MEME KANSERİ DOKU
ÖRNEKLERİNDE p95-HER2 EKSPRESYONUNUN PREDİKTİF
VE PROGNOSTİK ÖNEMİ

Dr. MUHARREM KOÇAR
UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. PERRAN FULDEN YUMUK

İSTANBUL 2012

ÖNSÖZ

Yandal uzmanlık eğitimim süresince en büyük destek ve yakınlığı gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Nazım Serdar Turhal'a, Prof. Dr. Perran Fulden Yumuk'a, Doç. Dr. Faysal Dane'ye, Prof. Dr. İshak Çetin Özener'e, Prof. Dr. Handan Kaya'ya; birlikte çalışma fırsatını bulduğum İç Hastalıkları Anabilimdalı'nda görevli tüm doktorlara ve hemşirelere; her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Eylül 2012

Dr. Muharrem Koçar

ÖZET

Trastuzumab direncinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması HER2 pozitif metastatik meme kanserli hastaların prognozunu düzeltmek adına önem taşımaktadır. Deneysel olarak p95-HER2 pozitif meme tümörlerinin trastuzumaba dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada trastuzumab ile tedavi edilen HER2 pozitif metastatik meme kanserinde p95-HER2 ekspresyonun prediktif ve prognostik öneminin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamına histolojik olarak tanısı konmuş, HER2 pozitif metastatik MK olan ve trastuzumab içeren tedavi alan hastalar dahil edilmiştir. Hastaların mevcut doku bloklarında p95-HER2 ekspresyonu immünohistokimya yöntemi kullanılarak bakılmıştır.

Çalışma yaşları 30-84 arasında değişen 38 olgu üzerinde yapılmıştır. p95-HER2 hastaların %36,8'inde negatif, %63,2'sinde (n=24) pozitif bulunmuştur. p95-HER2 ekspresyonu ile genel sağkalım, trastuzumab yanıtları ve progresyonsuz sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu sonucu hasta sayımızın azlığına bağlayabileceğimiz gibi yöntem olarak IHC'nin kullanılmasının p95-Her2 saptanmasında yetersiz olduğu düşünülebilir. IHC'nin p95-HER2 değerlendirilmesinde uygun bir yöntem olup olmadığını belirlemek için daha fazla hastanın alındığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler; meme kanseri, HER2, trastuzumab, trastuzumab direnci, p95-HER2.

ABSTRACT

It is important to reveal the mechanisms of trastuzumab resistance to improve the prognosis of HER2 (+) metastatic breast cancer patients. It was shown that breast cancer harboring p95-HER2 positivity is resistant to trastuzumab. The aim of this study is to show the predictive and prognostic value of p95-HER2 expression in HER2 (+) metastatic breast cancer treated with trastuzumab.

Patients treated with trastuzumab who have HER2 (+) metastatic breast cancer are included. p95-HER2 expression is studied with immunohistochemistry method in patients' tissue blocks.

Thirty eight patients between the ages of 30-84 were included. P95-HER2 is found to be negative in 36.8 % and positive 63.2 % of patients. There were no any statistical significant differences between p95-HER2 expression and general survival, trastuzumab response and progression free survival. This outcome may be related to the low number of tumor samples included our trial or the immunohistochemistry method used for p95-HER2 expression might be an. More trials with more number of patients are needed to show if immunohistochemistry is an adequate technique to show p95-HER2 expression.

Key words; breast cancer, HER2, trastuzumab, trastuzumab resistance, p95-HER2.

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract).....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	v
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1 Epidemiyoloji.....	2
2.2. Etyoloji.....	2
2.3. Meme Kanseri Biyolojisi.....	3
2.4. Trastuzumab.....	8
2.5. Trastuzumaba Direnç Mekanizmaları.....	10
3. Gereç ve Yöntem.....	16
3.1. İstatistiksel İncelemeler.....	16
3.2. İmmünohistokimya yöntemi.....	17
4. Bulgular.....	19
5. Tartışma ve Sonuçlar.....	31
6. Kaynaklar.....	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADCC	:Antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksisite
BRCA	:Meme kanserine yatkınlık proteini
CDK	:Cyclin-dependent kinase
CXCR4	:C-X-C chemokine receptor type 4
ER	:Östrojen reseptörü
HER2	:İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IGF-IR	:İnsulin benzeri büyüme faktör-1 reseptörü
IHC	:İmmünohistokimya
MK	:Meme kanseri
PDK1	:3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PI3K	:Phosphatidylinositol 3-kinase
PR	:Progesteron reseptörü
PTEN	:Phosphatase and tensin homolog

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri (MK) kadınlarda tüm dünyada en sık görülen kanser tipidir ve kadınlarda kansere bağılı ölümlerde ilk sırayı almaktadır. Yeni açıklanan verilere göre 2008 yılı için tüm dünyada tahmin edilen yeni vaka sayısı 1.383.500, MK'ya bağılı ölüm sayısı ise 458.400 olarak tahmin edilmektedir (1,2). Toplam insidans oranlarının yılda ~%0.5 artacağı öngörüldüğünde 2010 yılında 1.4 milyon yeni MK olgusu beklendiği bildirilmiştir (1). Türkiyede ise sağılık bakanlığının 2006 yılı verilerine göre MK sıklığı 37/100000 olarak bildirilmiştir ve her yıl 30000 yeni vaka olacağı tahmin edilmektedir (3).

MK'ya bağılı mortalite az gelişmiş ülkelere gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek görünmektedir. İnsidans ve mortalitedeki bu farklılıkların altta yatan yaş, diyet, etnisite ve yaşam şekli gibi kompleks faktörlerdeki farklılıkların yansıması olduğu düşünölmektedir (4).

MK'nın genetik bir hastalık olduğunun belirlenmesi ve altta yatan moleküler lezyonların daha iyi anlaşılması, hastalığa yönelik tanı yöntemleri, önleme stratejileri ve tedavi olanaklarının artmasını sağlamıştır. MK'ya spesifik terapötik hedefler olan östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (ErbB2 veya HER2) keşfi ise bu hedefleri taşıyan MK hastalarının tedavisindeki en önemli gelişme olmuştur.

Trastuzumab direncinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması HER2 pozitif metastatik MK'lı hastaların prognozunu düzeltmek adına önem taşımaktadır. Deneysel olarak p95-HER2 aşırı ekspresyonu olan HER2 pozitif meme tümörlerinin trastuzumaba dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada trastuzumab ile tedavi edilen HER2 pozitif metastatik MK'da p95-HER2 ekspresyonun prediktif ve prognostik öneminin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

MK dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen kanser tipidir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer almaktadır. MK sıklığı ülkeler arasında farklılık göstermekte ve bu fark özellikle menapoz sonrası kadınlarda daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır. Yaşa bağlı en yüksek görülme oranı yılda her 100.000 kadında 86.3 ile Kuzey Amerika'da, en düşük oran ise 11.8 ile Çin'de görülmektedir. Buna karşın en düşük mortalite oranı yine Kuzey Amerika'ya aittir. Çin ve Afrika'da MK insidansı çok düşük olmasına karşın mortalite oranları yüksek seyretmektedir (1,2).

Türkiye'de 2006 yılı verilerine göre MK sıklığı 37/100000 olarak bildirilmiş olup her yıl 30000 yeni vaka olacağı tahmin edilmektedir (3). İnsidans ve mortalitedeki bu farklılıkların altında yatan yaş, diyet, etnisite ve yaşam şekli gibi kompleks faktörlerdeki farklılıkların yansımaları olduğu düşünülmektedir (4).

2.2. Etyoloji

Olguların büyük çoğunluğunda etyoloji bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel koşullar rol oynamakta ve çeşitli risk faktörleri tanımlanmaktadır. Kişiler arasında, karsinojen metabolizmasını oluşturan biyosentetik yollarda ve steroid hormon metabolizmasında önemli farklılıklar vardır. Bu durum ksenobiyotik metabolizmasından sorumlu enzimleri kodlayan genlerin polimorfizmlerinden kaynaklanır. Bu gen polimorfizmleri yaşamı boyunca östrojen, östrojen metabolitleri ve diğer karsinojenlerden etkilenen kadınların alt popülasyonunu belirleyebilir (5,6). MK'da görülen çeşitli risk faktörleri tablo 1'de tanımlanmıştır (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.
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 homologue) mutasyonlarıdır (örneğin Cowden sendromu).

2.3. Meme Kanseri Biyolojisi

Kanserin genetik bir hastalık olduğunun kavranması ve gelişmekte olan çalışmalarla MK'nın altında yatan moleküler lezyonların açıklanması hastalığın tanısı, tedavisi ve önlenmesine yönelik avantajlar sağlamıştır. Yakın zamanda MK'ya spesifik ER ve HER2 reseptörünü hedef alan terapötik ajanların keşfi bu hedefleri taşıyan MK'lı hastalarda tedavi başarısını arttırmıştır.

2.3.1. Östrojen ve progesteron reseptörleri

Östrojen gerek normal meme epiteli gerekse MK gelişiminde önemli olup östrojen düzeyinin modülasyonu meme kanseri tedavisinde anahtar bir role sahiptir. Östrojenin meme epiteli ile ilişkisi nükleer transkripsiyon faktörü olarak görev yapan spesifik östrojen reseptörleri yoluyla meydana gelir (8). Bilinen 2 reseptör vardır bunlar; ER alfa ve ER beta'dır. Bu reseptörler farklı genlerle kodlanır. ER alfa izole edilen ilk reseptördür ve MK ile yakından ilişkilidir. Büyük oranda meme, uterus, over, ve endometriumdan eksprese edilmektedir. ER beta daha yaygın olarak eksprese edilmekle birlikte MK ile ilişkisi net değildir (9). MK'nın %70'i ER eksprese eder. Bu tümörler daha yavaş büyümeye eğilimli olup ER ekspresyonu olmayan tümörlere göre daha iyi diferansiyasyona sahip görünmektedir. Anti östrojen tedavi hem rekürrensın engellemesi hem de metastatik hastalarda sağkalımın uzamasında efektifdir. Bununla birlikte ER ekspresyonu ve kanserin oluşumu arasındaki ilişki açık değildir, çünkü proliferasyon olmayan ER ekspresyonlu hücreler ileri sürülen bir parakrin etkiyle normal meme epitelindeki proliferasyon olan hücrelere bitişik bir durumda bulunur. Parakrin etki hipotezi, ER pozitif tümörlerin çoğunda sadece hücrelerin küçük bir kısmının ER eksprese ettiği ve MK kök hücrelerinde ER ekspresyonunun olmadığını gösteren çalışmalarla desteklenmiştir.

Progesteron reseptörü (PR) PR-A ve PR-B olarak 2 ayrı izoforma sahiptir. PR-B izoformu MK'ya daha fazla spesifik olmakla birlikte PR-A daha yaygın olarak eksprese edilmektedir. İlginç olarak PR promoterindeki PR-B transkripsiyonunu arttıran bir polimorfizm endometrium kanseri ve MK riskinin yükselmesi ile ilişkilidir. ER pozitif tümörlerde PR değişken oranlarda eksprese olup prognozla da ilişkilidir. ER pozitif PR negatif tümörler 50 yaş üstündeki kadınlarda daha yaygındır. Bu tümörler ER ve PR pozitif tümörlerden daha aneuploid ve büyük tümörler olmaya eğilimli olup sıklıkla nodal tutulum gösterirler. Bunun yanında ER ve PR pozitif tümörler anti östrojen tedavisine ER pozitif PR negatif tümörlerden daha iyi yanıt verirler (10,11).

2.3.2. BRCA1, BRCA2 ve meme kanserine herediter yatkınlık

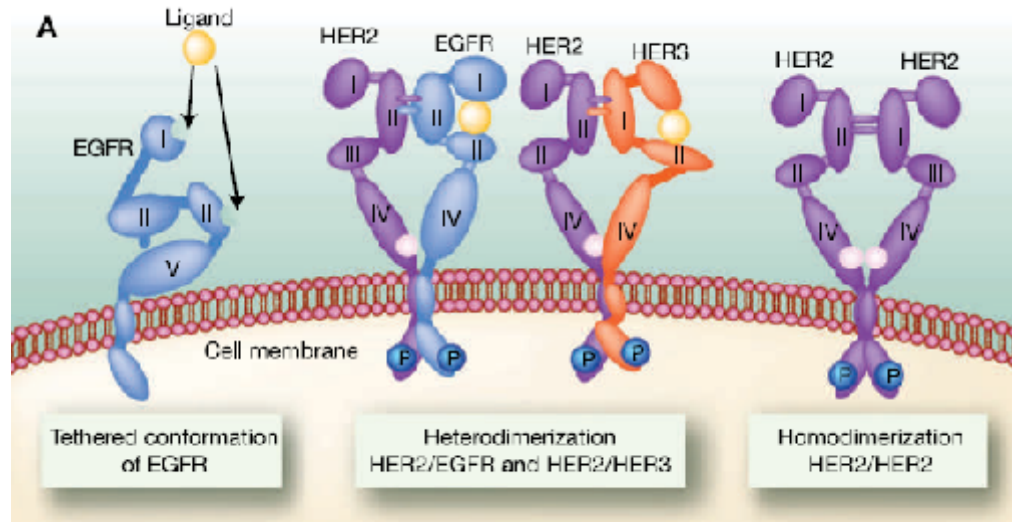
Tüm MK vakalarının yaklaşık olarak %5-10'u herediter gen mutasyonlarına yatkınlık durumunda gelişir ki bu vakaların çoğunda sorumlu olarak MK yatkınlık genleri olan BRCA1 ve BRCA2 identifiye edilmiştir (12). BRCA1'de germline mutasyon taşıyan kadınların hayatı boyunca MK geliştirme insidansı kümülatif olarak %50-85 ve over kanseri geliştirme ihtimali %40-60'dır (13). BRCA1; DNA hasar onarımı, hücre siklus döngüsü, transkripsiyonel regülasyon ve kromatin düzenlenmesini içeren çeşitli selüler olaylarda rol oynarken BRCA2, temel olarak DNA rekombinasyonu ve onarımında rol alır. BRCA1 çoğunlukla basal tip MK ile ilişkilidir.

2.3.3. TP53

TP53 (p53) kanser oluşumunda sıklıkla mutasyona uğrayan bir gendir. P53, N-terminal ucunun post-translational modifikasyonu ile (fosforilasyon, ubikinyasyon) aktive ve regüle edilir. Temel biyolojik fonksiyonu gen transkripsiyonunun modifikasyonudur (14). Yakın zamanda Avrupa kökenli 1794 hastanın en az 10 yıllık takiple değerlendirildiği bir çalışmada exon 5-8 arasındaki mutasyonların duktal ve medüller tümörlü agresif fenotipli hastalarda (yüksek grade, büyük tümör, nod pozitifliği ve düşük hormon reseptör durumu) daha yaygın saptandığı analiz edilmiştir. İlave olarak MK'ya spesifik ölüm riskinin bilinen diğer prognostik faktörlerden (tümör boyutu, nod durumu, ER/PR reseptör ekspresyonu) bağımsız olarak 2.27 kat arttığı da bu çalışmada öngörülmüştür (15). P53 ekspresyonu ile kemoterapi rezistansı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yapılan çalışmaların bir kısmında p53 mutasyonu olan MK'lı hastaların hem anti östrojen hem de antrasiklinlerden daha az yararlandığı bildirilmiştir. Ancak bu analizler kullanılan farklı p53 assay metodları ve çalışmaya alınan hastaların çeşitliliği (adjuvan, preoperatif ve metastatik) nedeniyle çelişkilidir. P53'ün kanser tedavisi için bir hedef olduğu açık olmakla birlikte genotip fonksiyonunun kaybı problemlili görünmektedir (16,17).

2.3.4. HER2

Bir transmembran tirozin kinaz reseptörü tarafından kodlanan ve bir protoonkogen olan ERBB2; EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3), ve ERBB4'den (HER4) oluşan growth faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörlerin ligandları “heregulin” olarak adlandırılmakta ve ERBB3 ve ERBB4'e bağlanarak ERBB2'nin heterodimerizasyonu indükleyerek bunu izleyen downstream sinyal iletimini başlatmaktadırlar. HER2 liganda direkt olarak bağlanamaz ve diğer büyüme faktörü reseptörleriyle heterodimerizasyon sağlayarak aktive olur. Bunların arasında HER3 en iyi heterodimerizasyon partneri olarak görülmektedir (18).



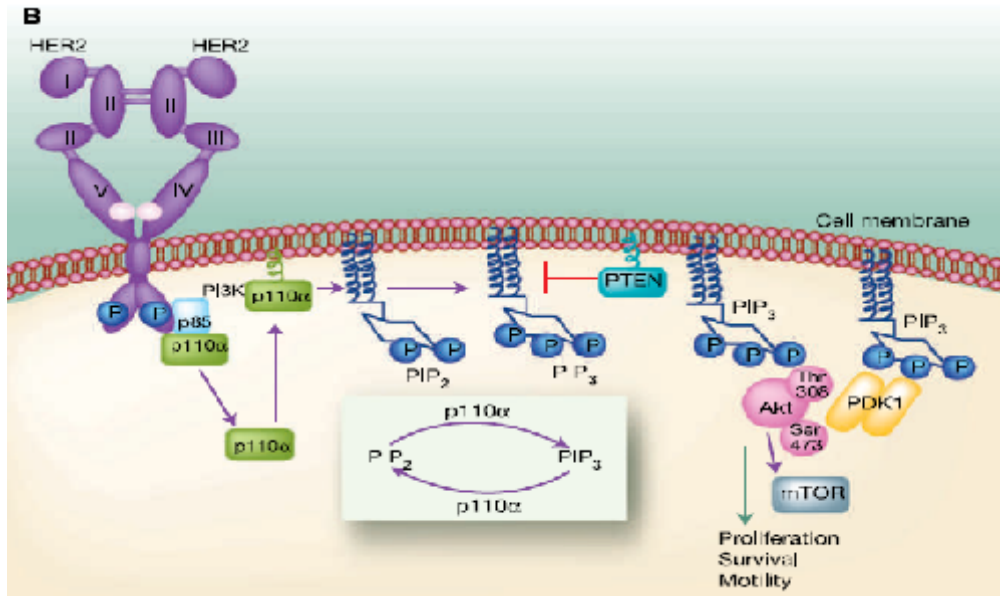
Şekil 1. HER2 aktivasyonunun şematik gösterimi. HER2 fonksiyonu için reseptör dimerizasyonu gerekmektedir. Ligand yokluğunda EGFR, HER3 ve HER4'ün tetramer konfigürasyonda olduğu düşünülür (18).

HER2 amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonu yeni tanı MK hastalarında %20 oranında saptanmakta ve normal HER2 düzeyli hastalarla karşılaştırıldığında daha agresif klinik gidiş ve azalmış sağkalım ile ilişkili bulunmaktadır (20). Amplifikasyon HER2 protein ekspresyonunun aşırı derecede artmasına ve RAS-MEK ve AKT adı verilen reseptör tirozin kinaz sinyal yollarının devamlı uyarılmasına neden olur. HER2'nin bir onkogen olarak MK'da identifikasyonu hedefe yönelik tedavi stratejilerinin gelişimine olanak sağlamıştır. HER2'nin ekstraselüler domainine bağlanan trastuzumab bir insan monoklonal antikorudur ve

tek ajan olarak kullanıldığında klinik yanıt sağlamakta, kemoterapi ile kombine kullanımda sağkalımı uzatmakta ve HER2 aşırı eksprese tümörlerde adjuvan tedavide rekürrensi yaklaşık %50 oranında azaltmaktadır (21). Yakın zamanda HER2'ye karşı etkili küçük bir molekül olan tirozin kinaz reseptör inhibitörü lapatinibin metastatik HER2-pozitif MK'lı hastalarda yararı gösterilmiştir. Ancak HER2 pozitif MK'lı hastaların tümü trastuzumab veya lapatinibe yanıt vermemektedir. HER2 pozitif MK'lı hastalarda rezistansın patofizyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar sürmektedir.

2.3.5. PI3K ve PTEN

Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃), PIP₃ kinaz tarafından oluşturulmuş reseptör tirozin kinaz sinyal yoluna cevap amacıyla oluşturulmuş lipid yapılı bir ikincil mesaj ileticidir. PIP₃, AKT ve diğer ilişkili sinyal yollarını aktive ederek proliferasyonu uyarırken apoptozu inhibe eder.

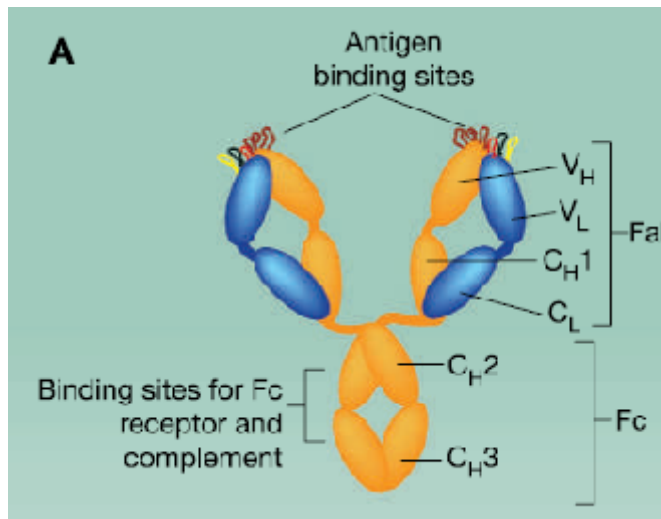


Şekil 2. HER2 aktivasyonunun yer aldığı PI3K/Akt yolunun işleyişi. PI3K, 85-kDa regülatör ve 110-kDa katalitik bir subuniteye sahiptir. PTEN, PI3K/Akt yolunun negatif regülatörüdür ve bir tümör supresör olarak fonksiyon görmektedir (22).

MK'nın yaklaşık %25'inde PI3K'nın p110 katalitik alt ünitesinde onkogenik aktive mutasyon (PIK3CA) vardır (22). Bu sinyal bir tümör supresör gen olan PTEN'in fosfataz işleyişine engel olmasıyla inaktive olur. PTEN kaybı genetik instabiliteyle ilişkili olup PTEN kaybı olan primer meme tümörlü hastalarda artmış aneuploidi görülür (23). Buna ilave olarak PTEN kaybı, trastuzumab ile yapılan anti HER2 tedavisine yanıtın büyük olasılıkla azalmasıyla da ilişkilidir (24). Yakın zamanda yapılan çalışmalar PIK3CA mutasyonu varlığı ile PTEN durumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. İlave olarak HER2-pozitif veya ER-pozitif tümörlerde PIK3CA mutasyonu iki kat daha yaygın görülür ki bu durumda intakt PTEN etkisini ortadan kaldırmak için birden fazla AKT upstream abrazyonun gerekli olabileceği ileri sürülmüştür (25).

2.4. Trastuzumab

Trastuzumab HER2'nin ekstraselüler bölgesine karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. Trastuzumabın etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bir IgG1 olan trastuzumab, Fab ve Fc adı verilen 2 bölgeye ayrılır. Fab antikorun antijen bağlayan bölgesidir. Fc bölgesi ise immün hücreler, trombosit, hepatosit ve endotelial hücrelerdeki Fc reseptörleri için bağlanma bölgeleri içerir. Fab bölgesi trastuzumabın farmakodinamik çalışmalarının çoğundan sorumludur oysa ki Fc bölgesi hem farmakodinamik hemde farmakokinetik etkilerle ilişkilidir. (19).



Şekil 3. Trastuzumabın şematik çizimi (19).

2.4.1. Trastuzumabın Fab ilişkili fonksiyonları

Trastuzumab, HER2'nin ekstraselüler bölgesine yüksek afiniteyle bağlanarak siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27 upregülasyonu ile G1 aresti ile sonuçlanacak sitostatik bir yanıt üretir (26). Bu yanıt 10. kromozom üzerinde yerleşmiş PTEN kaybı ve fosfataz aktivitesinin artmasıyla bloke olur (24). HER2 aşırı eksprese hücre hatlarının proliferasyonunun devamında HER2- HER3 birleşmesi kritiktir ve HER3 ligandın varlığına bağlıdır (27). Ligand varlığında trastuzumab EGFR ve HER2 arasındaki etkileşimi bozabilir fakat HER2-HER3 arasındaki etkileşime engel olmaz (28).

HER2'nin proteolitik yıkımıyla p95HER2 oluşur. Trastuzumab HER2'nin proteolitik yıkımına karşı da bir blokaj oluşturur (29). Trastuzumab farklı pro ve anti angiogenik faktörlerin etkilerini düzenler ve buna ek olarak HER2 aşırı eksprese hayvan modellerinde vaskülarizasyonun regresyonunu ve normalizasyonunu indükler ve vascular endothelial growth factor (VEGF) üretimi azalır (30).

2.4.2. Trastuzumabın Fc ilişkili fonksiyonları

Çeşitli xenograft modellerde trastuzumabın antitümöral etkinliği için işlevsel bir Fc reseptörünün ve antikör bağımlı selüler sitotoksitenin (ADCC) önemi gösterilmiştir. Trastuzumabın Fc ilişkili kompleman aktivasyonunun klinik önemi daha az açıktır. Trastuzumabın, kompleman sabitleme ve HER2 pozitif hücre hattı BT474'ün in vitro destrüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (31,32). Musolino ve ark. trastuzumab ile tedavi edilen hastalarda ADCC kapasitesi ile FcγR polimorfizmi arasındaki ilişkiyi açık olarak göstermiştir (33).

Fc aracılı sitotoksiteden başka Fc parçasının trastuzumabın serum düzeyinin sürdürülmesinde de önemi vardır. İntakt IgG serumda daha stabil ve Fab fragmentinden daha uzun yarı ömre sahiptir (19). Petkova ve ark. insan FcRn Xenograft modeli kullanarak in vivo trastuzumabın ve çeşitli trastuzumab Fc mutantlarının (pozisyon 253'de izolösin-alanin yerdeğişimi) yarı ömrünü değerlendirmişler ve orijinal tip trastuzumabla karşılaştırıldığında mutant antikörlerin daha kısa yarı ömre sahip olduğuna işaret etmişlerdir. Mutant antikörlerin FcRn'ye bağlanmada başarısız olduğunu da öngörmüşlerdir (34).

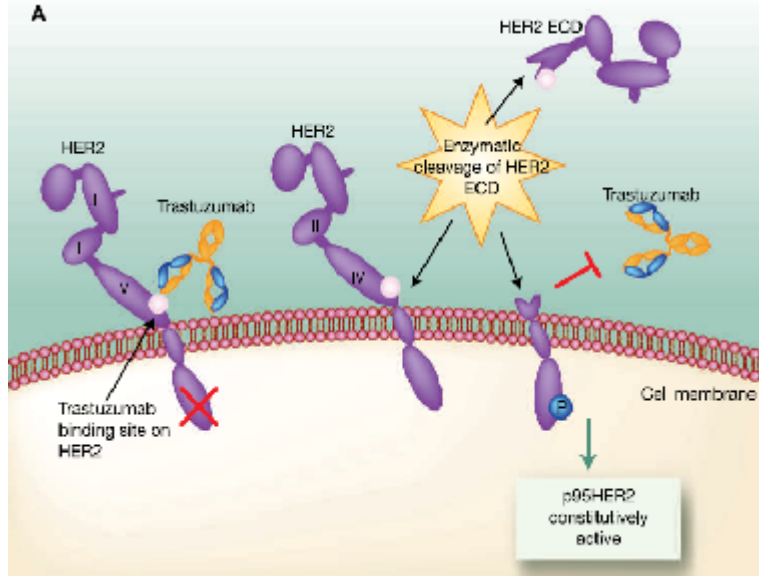
2.5. Trastuzumaba Direnç Mekanizmaları

2.5.1. HER2'ye trastuzumab bağlanmasının engellenmesi

2.5.1.1. p95HER2.

Esas olarak HER2 reseptörün enzimatik yıkımla kesilmiş formu olan P95HER2, kinaz aktivitesine sahiptir ancak ekstraselüler domain ve trastuzumab bağlanma bölgesi yoktur. Nod pozitif hastalar nod negatif hastalardan daha yüksek oranda p95HER2 ekspresyonunu göstermektedir (35). Her ne kadar in vitro veriler trastuzumabın p185HER2 (full uzunlukta HER2) parçalanmasını ve sonuç olarak p95HER2 üretimini engellediğini öne sürse de retrospektif bir çalışma p95HER2 varlığı ve trastuzumab tedavisine klinik rezistans arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmıştır. Bu çalışmada 46 metastatik MK hastasının immünofloresan yöntemle p95HER2 düzeyi ölçülmüş ve p95HER2 ekspresyonu olan 9 hastadan sadece biri (%11.1) trastuzumaba yanıtlyken p185HER2 ekspresyonu olan 37 hastanın 19'unda (%51.4) trastuzumaba yanıt elde edilmiştir (36).

Eldeki diğer bir veri de ekstraselüler alana trastuzumab bağlanmasıdır. Trastuzumab-ekstraselüler domain kompleksinin serbest trastuzumabdan kleransının daha hızlı olduğu farmakokinetik popülasyon çalışmalarında ve prelinik modellerde gösterilmiştir (37). Trastuzumabın tek ajan olarak HER2 pozitif metastatik MK'lı hastalarda değerlendirildiği bir faz 2 çalışmada ekstraselüler domain plazma konsantrasyonunun 500 ng/ml'den fazla olmasıyla daha kısa serum yarı ömür ve trastuzumab subterapötik aralığı arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (38). HER2 ekstraselüler domain uzun süredir tedavi yanıtı için potansiyel prediktif bir faktör olarak değerlendirilmektedir ancak trastuzumab kullanan metastatik MK'lı hastaların değerlendirildiği 4 klinik çalışmanın toplandığı bir analiz hem ekstraselüler domain baseline düzeyi hem de tedaviyi takiben ekstraselüler domain düşmesinin trastuzumab tedavisinin klinik yararı için düşük bir prediktif değere sahip olduğunu açığa çıkarmıştır (39).



Şekil 4. HER2'nin enzimatik yıkımıyla trastuzumabın HER2'ye bağlanmasının engellenmesi (19).

2.5.1.2. Mucin4

Epitop maskelenmesi, trastuzumab rezistansında bir mekanizma olarak irdelenmiştir. MUCİN 4 (MUC-4) uzun ve O-glikozid membran ilişkili bir glikoproteindir ve HER2 reseptöre trastuzumab bağlanmasını engelleyebilir (40). Nagy ve ark. primer olarak trastuzumaba dirençli HER2 pozitif JIMT-1 hücre serileri kullanılarak oluşturulan prelinik modelde MUC-4 varlığı ile epitopun gizlenmesi ve azalan antikor bağlanma kapasitesi arasında bir ilişki olduğunu gözlemlemişlerdir (41).

2.5.1.3. CD44/hyaluronan kompleks

CD44, hyaluronan için bir transmembran reseptörüdür. Over kanseri hücrelerinde hyaluronanın CD44'e bağlanması RAS ve PI3K içeren sinyal yollarını harekete geçirir. CD44/hyaluronan kompleks epitopu gizleyerek HER2 reseptöre trastuzumabın geçişini engelleyebilir ve rezistansa neden olur (42). Palyi-Krekk ve ark. bir hyaluronan sentez inhibitörü ile tedavi edilen JIMT-1 hücrelerinde hem in vivo hem de in vitro olarak anlamlı şekilde hyaluronan düzeyinin düştüğünü ve

bunun HER2'ye trastuzumab bağlanmasını arttırdığını ve sonuç olarak antitümöral etkiyi göstermişlerdir (43). Muc 4 normalde epitel hücre yüzeyinde bulunur ancak çeşitli karsinomlarda overekprese olabilir. Hyaluronan sentezinin inhibe edilmesi invitro CD44/hyaluronan kompleksini azaltır ve HER2'ye trastuzumab bağlanmasını arttırır (19).

2.5.2. HER2 downstream sinyal yolunun up regülasyonu

2.5.2.1. PTEN

PTEN'nin transkripsiyonel regülasyonu veya mutasyonuyla gelişen fonksiyon kaybı çeşitli tümörlerde ve MK vakalarında %50'ye varan oranda tanımlanmıştır (44). PTEN normalde PI3K aktivasyonunu inhibe eder. Bu yüzden esas olarak PTEN kaybı PI3K/Akt upregülasyonuna neden olur. Nagata ve ark., PTEN fosfataz düzeyindeki azalmanın, PI3K/Akt fosforilasyonu ve sinyalindeki artışa ve HER2 overekprese meme kanseri hücrelerinde trastuzumab aracılı büyüme duraklatılmasının engellenmesine neden olduğuna işaret etmişlerdir. PTEN defisitli HER2 overekprese metastatik MK'lı hastalar trastuzumab bazlı tedavilere normal PTEN ekspresyonlu hastalara göre anlamlı şekilde daha kötü yanıt sergiler (24).

2.5.2.2. PI3K

PI3K mutasyonları PI3K/Akt yolunun aktivasyonuna neden olarak trastuzumab direncine aracılık eder. PIK3R1 geni PI3K regülatör subünit p85'ı kodlar. PIK3R1 mutasyonları esas olarak PI3K/Akt yolunun aktivasyonunu indükleyen p85 fonksiyonunu etkiler (45). Buna ilave olarak PI3K'nın p100 katalitik subünitesini kodlayan PIK3CA geni de insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona ve overekprese olur (25). Berns ve ark. trastuzumaba düşük yanıt oranları olan 55 hastalık bir kohortta, anlamlı şekilde düşük PTEN ekspresyonu ve onkogenik PIK3CA mutasyon varlığını tanımlamışlardır (46).

2.5.2.3. Akt and PDK1 değişiklikleri

Önceden trastuzumaba sensitif olan hücrelerin trastuzumab içeren ortamda devamlı kültüre edilmesiyle elde edilen trastuzumaba dirençli BT474 hücreleri, parental

BT474 hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında rezistans hücrelerde Akt fosforilasyonunun ve Akt kinaz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (47). MK'lı hastaların yaklaşık %20'sinde PDK1 aşırı ekspresyonu saptanmıştır (48). Tseng ve ark. PDK1 inhibitörü ve trastuzumabın birlikte kullanımını, trastuzumaba dirençli insulin like growth faktör-1 reseptörü (IGF-IR) aşırı eksprese eden SKBR3 hücrelerinde değerlendirmişler ve PDK-1 inhibisyonunun trastuzumab dirençli fenotipi tersine çevirdiğine işaret etmişlerdir (49).

2.5.3. Alternatif reseptör yoluyla sinyal iletimi

2.5.3.1. IGF-1R

Hücre proliferasyonunu stimüle eden diğer bir transmembran tirozin kinaz reseptörü olan IGF-1R'in trastuzumab rezistan hücre hatlarında HER2 ile etkileşerek fosforilasyonu indüklediği saptanmıştır. Anti- IGF-1R kullanılan prelinik modellerde trastuzumab rezistans hücrelerdeki sensitivitenin düzeldiği saptanmıştır (50). Lu ve ark. HER2 overekspresyonlu hücrelerde trastuzumabla indüklenen büyüme inhibisyonunun IGF-1R sinyal artışıyla dengelenebileceğini ve bunun trastuzumab rezistansına neden olabileceğini göstermişlerdir (51). Harris ve ark. HER2 aşırı eksprese operabl MK'lı hastalarda neoadjuvan trastuzumab ve vinorelbin tedavisinin klinik yararını ve tedaviye yanıtta potansiyel prediktörleri bir klinik çalışmada değerlendirmiştir. Bu çalışmada IGF-1R membran ekspresyonunun varlığıyla düşük yanıt oranları arasında ilişki saptanmıştır. Sonuç olarak IGF-1R ekspresyonlu HER2 aşırı ekspresyonu olan tümörlerin, büyük olasılıkla trastuzumab içeren rejimlere dirençli olduğu ileri sürülmüştür (52).

2.5.3.2. P27

Hücre proliferasyonu ile ilişkili bir Cdk inhibitörü olarak p27 distal downstream yol regülatörüdür. Nahta ve ark. HER2 overeksprese trastuzumaba dirençli hücrelerde, düşük p27 düzeyi, düşük p27/Cdk2 kompleks ve dolayısıyla artmış Cdk2 aktivitesi ve proliferasyon oranını göstermişlerdir. Transfeksiyon veya bir proteasome inhibitörüyle farmakolojik olarak p27 ekspresyonu arttırıldığı zaman trastuzumab sensitivitesi onarılmaktadır (53).

2.5.3.3. EGFR ve HER3

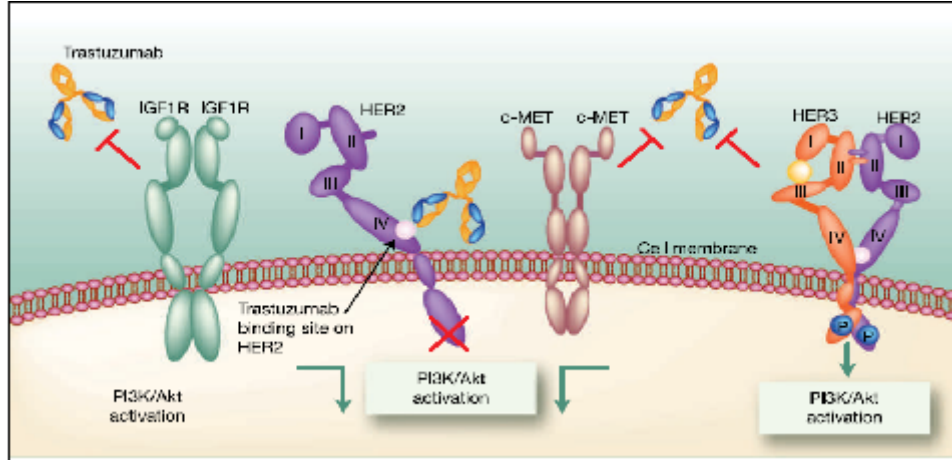
EGFR homodimer, EGFR/HER3 heterodimer ve HER2 eksikliği potansiyel olarak trastuzumab blokajını aşabilir. Buna rağmen HER2 overeksprese MK'da bu dimerler daha az olasılıkla çalıştırılır çünkü HER2 heterodimerler bu reseptör ailesinde daha tercihlidir (54). Yakın zamanda yapılan çalışmalar kültürde uzun dönem trastuzumab maruziyeti sonrası hem EGFR hem de HER3 ekspresyon artışını trastuzumab rezistans mekanizması olarak incelemektedir. İlginç olarak trastuzumaba dirençli hücre hatlarının kronik trastuzumab maruziyeti anti-EGFR ajanlara sensitiviteyi indükler. Ancak EGFR tirozin kinaz inhibitörü gefitinib ile haftalık trastuzumab kullanımının güvenilirliği ve etkinliğini değerlendiren faz1 ve faz2 klinik çalışma sonuçları, trastuzumabın tek başına kullanılmasıyla karşılaştırıldığında kuşkuludur (55). Öte yandan bir EGFR/HER2 tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib, trastuzumabla progrese olan hastaların tedavisinde klinik aktiviteye sahiptir. Fakat bu etki HER2 tirozin kinaz inhibisyonuna bağlı gerçekleşmiş olabilir (56).

2.5.3.4. c-MET

Hücre hatlarında HER2 ile birlikte sıklıkla co-eksprese olan c-MET reseptörü Akt aktivasyonuna destek sağlamak yoluyla trastuzumab direncine katkıda bulunabilir. HER2 aşırı eksprese hücreler c-MET reseptör ekspresyonu upregülasyonu ile trastuzumaba yanıt verirler ve c-MET aktivasyonu trastuzumaba karşı hücreleri korur. Bu hücrelerde c-MET fonksiyonunun RNA interference yoluyla kaybı trastuzumaba yanıtı iyileştirir (57).

2.5.3.5. CXCR4, $\alpha\beta1$, ve $\alpha\beta4$ integrinler

Trastuzumaba karşı kazanılmış direnç CXCR4 upregülasyonu ve nükleer redistribüsyonu ile ilişkilidir. CXCR4 inhibisyonunun tersine çevrilmesi in vitro trastuzumab direncine neden olur. İn vitro deneysel çalışmalar hem $\alpha\beta1$ hem de $\alpha\beta4$ integrinlerin de novo ve/veya kazanılmış dirençte rolü olduğuna işaret etmektedir (58,59).



Şekil 5. Alternatif reseptör ve/veya yol ile sinyal iletiminin mekanizmalarına örnekler (19).

2.5.4. Tümör hücrelerinin yıkımı için immün aracılı mekanizmanın başlatılmasında başarısızlık

Genomik bir polimorfizm olarak FcγRIIIa'nın 158.aminoasitte valin (V) veya fenilalaninin (F) ekspresyone olan fenotipinin üretimi Fcγ reseptöre IgG1'in afinitesini anlamlı şekilde etkiler. FcγRIIIa V/V alelleri taşıyan immün efektör hücreler trastuzumabın ADCC'sine aracılık eder ve anti-HER2/neu IgG1 varyantları F aleli taşıyan hücrelerden daha iyidir (60). Klinikte FcγRIII 158V/F polimorfizmi in vitro olarak trastuzumab tedavisi sırasında oluşturulan ADCC cevabıyla çatışmakta ve trastuzumabla tedavi edilen vakalarda anlamlı şekilde klinik yanıt oranlarını ve progresyonsuz sağkalımı düşürmektedir (33). Lazar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada mühendislik yöntemlerle tanımlanan Fc varyantları ile düzelen FcγR afinitesi ve spesifitesi ile in vitro sitotoksitate artırılmış. Bu afinite artışı ve ADCC, FcγRIIIa'nın V158 ve F158 formlarının her ikisiyle de gerçekleşmiş. Araştırmacılar bu süreci terapötik mAb'lar tasarlamak için ümit verici olarak nitelendirmektedir. İlave olarak trastuzumabın klerans mekanizması iyi tanımlanmamıştır. Enfeksiyon, inflamasyon ve tümör çevresiyle ilişkili proteazların IgG moleküllerini böldüğü gösterilmiştir. Bu antikor fargmentleri hala aynı antijenlere bağlanabilir. Fakat kompleman ve Fc reseptör için bağlanma bölgesi eksikliğinden ADCC gibi Fc-aracılı fonksiyonlar tetiklenemeyebilir (62).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamına T.C. Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda takip edilen ve doku örnekleri Patoloji Anabilim Dalı tarafından incelenerek histolojik olarak tanısı konmuş, HER2 pozitif metastatik MK olan ve trastuzumab içeren tedavi alan hastalar dahil edilmiştir. Hastaların mevcut parafin meme kanseri doku bloklarında p95-HER2 ekspresyonu immünohistokimya (IHC) yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca tüm boyalı kesitler patoloğ tarafından histolojik grade, hormon reseptör durumları ve HER2 sonuçları bilinmeden kör olarak incelenmiştir.

p95-HER2 ekspresyonu olan ve olmayan gruplar arasında tanı sırasındaki hastalık evresi, histolojik grade, hormon reseptör durumu, trastuzumaba objektif yanıt, progresyona kadar geçen süre (TTP) ve genel sağkalım farkı araştırılmıştır. Genel sağkalım (OS) 2 gruba ayrılarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Buna göre ilk MK tanısı tarihinden (OS1) için ve trastuzumab içeren tedavinin başladığı tarihten (OS2) için ölüm veya son izlem tarihine kadar geçen süre hesaplanmıştır. TTP trastuzumab içeren tedavinin başladığı tarihten hastalık progresyonunun saptandığı tarihe kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Trastuzumab bazlı tedaviye yanıt modifiye RECİST (response evaluation criteria in solid tumors) kullanılarak her 8-12 hafta arasında değerlendirildi.

Çalışma için etik kurul başvurusu yapılmış ve 23.02.2012 tarihinde 09.2012.0007 protokol no'su ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

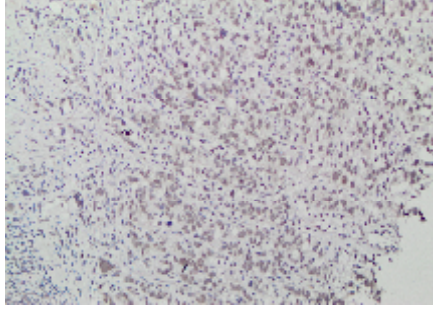
3.1. İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında da Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin

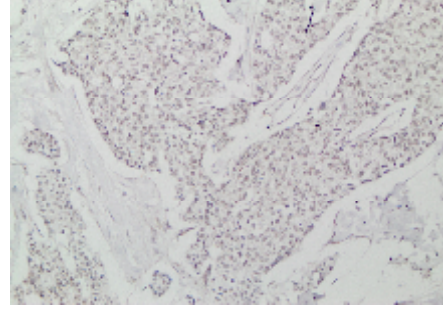
karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi; Yates düzeltmeli Ki kare testi ve Fisher's Exact test kullanıldı. Survi analizlerinde Kaplan Meier Survi analizi ve Log Rank analizi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

3.2. İmmünohistokimya yöntemi

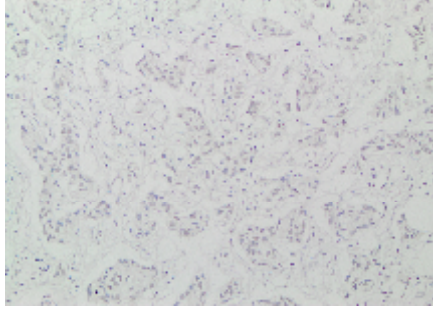
Formalin fiske dokularda, p95Her2 immünoekspresyonunu göstermek amacıyla streptavidin biotin peroksidaz immünohistokimya boyama yöntemi uygulandı. Bu yöntemde, parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamlara 3µm kalınlığında kesitler alındı ve 37°C' de 1 gece deparafinize edildi, ardından üç ayrı ksilende beşer dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Kesitler iki ayrı %96'lık etanolden geçirildi ve dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit (metanolde) ile baskılandı. Distile su ile yıkanan kesitlere, maskelenen antijenleri açığa çıkarmak amacıyla, mikrodalga fırında pH 6 sitrat tampon çözeltisi ile antijen geri kazanım işlemi uygulandı. Oda ısısında 20 dakika soğutulan lamlar iki ayrı fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı ve non spesifik boyanmayı engellemek için dokulara 10 dakikalık protein blokajı (Histostain Bulk Kit, İnvitrogen LAB-SA Detection System, UK) yapıldı. Blokajın ardından ayrı kesitlere 1:1000 dilüsyon oranında p95 (NBS1 (phospho S432) antibody [EPR2470Y], Abcam, USA) damlatılarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kesitler iki ayrı PBS ile yıkandı ve biotinlenmiş sekonder antikorda (Histostain Bulk Kit, İnvitrogen LAB-SA Detection System, UK) 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile yıkamanın ardından streptavidin peroksidaz (Histostain Bulk Kit, İnvitrogen LAB-SA Detection System, UK) damlatılarak 10 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojeni damlatıldı ve 5 dakikalık inkübasyon sonrasında boyanma kontrol edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve etanolden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilene alınarak uygun kapama maddesi ile kapatılan dokular ışık mikroskopunda (BX51 Olympus, Japan) değerlendirildi. P95-HER2 tümör dokusunda % 10'un üstünde nükleer boyanma göstermiş ise pozitif kabul edilmiştir.



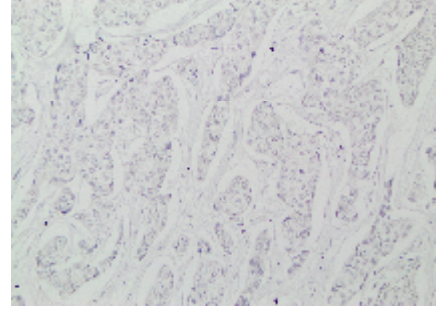
Resim 1a: p95-Her2 yoğun şiddette boyanma örneği (x20)



Resim 1b: p95-Her2 orta şiddette boyanma örneği (x20)



Resim 1c: p95-Her2 zayıf şiddette boyanma örneği (x20)



Resim 1d: p95-Her2 negatifliği (x20)

4. BULGULAR

Çalışma Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniği'nde Her2 pozitif metastatik MK tanısı ile trastuzumab uygulanan toplam 38 olgu üzerinde yapılmıştır. Olguların tanı tarihindeki yaşları 30 ile 84 arasında değişmekte olup, ortanca yaşın 50 olduğu gözlenmektedir. Olguların menapoz durumu, meme operasyonu, tanıdaki evreleri, tümör gradları ve hormon reseptör durumu tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı

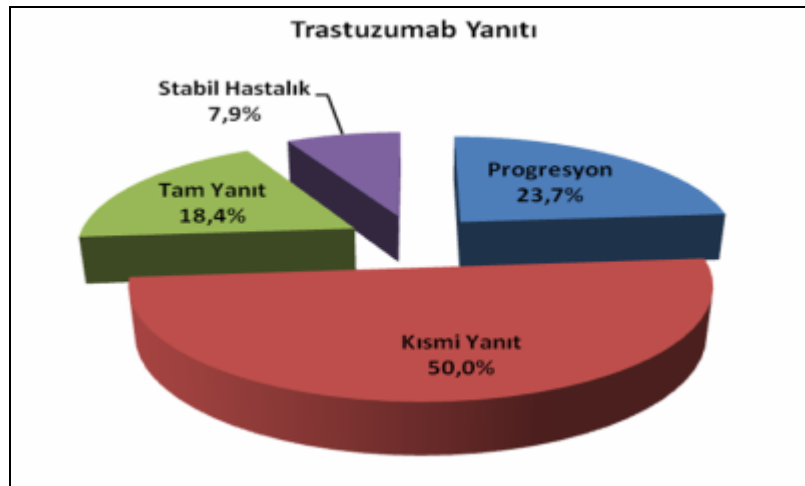
		n	%
Menopoz Durumu	Post	24	63,2
	Pre	14	36,8
Meme Operasyonu	Evet	25	65,8
	Hayır	13	34,2
Grade	1	1	2,6
	2	23	60,5
	3	14	36,8
Hormon Reseptörü	Negatif	24	63,2
	Pozitif	14	36,8
Tanı Evresi	1	1	2,6
	2	5	13,1
	3	11	29
	4	21	55,3

Olguların adjuvan KT, adjuvan RT, adjuvan anti hormonal tedavileri, metastaz yerleri ve metastatik dönemde trastuzumab ile birlikte uygulanan ek tedavileri tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. Tedavilerin, Metastaz Yerlerinin ve Ek Tedavilerin Dağılımı

		n	(%)
Adjuvan KT	Evet	13	34,2
	Hayır	25	65,8
Adjuvan RT	Evet	10	26,3
	Hayır	28	73,7
Adjuvan Anti Hormonal Tedavi	Evet	6	15,8
	Hayır	32	84,2
Metastaz Yeri	Kemik/Yumuşak Doku	19	50,0
	Visseral Organ	19	50,0
Ek Tedavi	Anti Hormonal Tedavi	6	15,8
	Kapesitabin	3	7,9
	Taksan Bazlı Tedavi	29	76,3

Olguların trastuzumab yanıtları incelendiğinde; %23,7'sinde (n=9) progresif hastalık; %50'sinde (n=19) kısmi yanıt; %18,4'ünde (n=7) tam yanıt alındığı ve %7,9'unda da (n=3) stabil hastalık gözlenmiştir.



Şekil 6. Trastuzumab Yanıtı Dağılımı

Sağkalım durumları incelendiğinde; olguların %18,4'ü (n=7) ölmüştür. Takip süresi ortanca 38.6 ay, PFS süresi ortanca 12.37 ay ve genel sağkalım süresi de ortanca 25.13 aydır.

Tablo 4. Sağkalım ve takip süreleri

	n	%	
Sağkalım	Ex	7	18,4
	Yaşıyor	31	81,6
	Min-max	Ort±SD	
Takip Süresi (ay) (n=38)	7,70-319,57	49,73±52,61	
PFS Süre (n=38)	2,80-64,93	16,68±15,30	
Genel Sağkalım (n=38)	6,50-70,43	27,86±17,65	

p95-HER2 hastaların %36,8'inde negatif, %63,2'sinde (n=24) pozitif bulunmuştur. p95-HER2 ile grade ve tanı sırasındaki evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 5. p95-HER2'ye göre değerlendirmeler

	p95-HER2		<i>P</i>	
	Negatif	Pozitif		
	(n=14)	(n=24)		
	n (%)	n (%)		
Grade	^b Grade 1	0	1 (%4,2)	1,000
	^a Grade 2	10 (%71,4)	13 (%54,3)	0,480
	^a Grade 3	4 (%28,6)	10 (%41,7)	0,646
Tanı Evresi	^b Evre 2	0	5 (%21,7)	0,135
	^a Evre 3	5 (%37,5)	6 (%26,1)	0,712
	^a Evre 4	9 (%64,3)	12 (%52,2)	0,606

Ki-Kare Test ^a*Yates Test* ^b*Fisher's Exact Test*. Evre 1'de 1 olgu bulunduğu için karşılaştırmaya dâhil edilmemiştir.

Tablo 6. P95'e göre hormon reseptör ve metastaz yeri değerlendirmesi

		p95-HER2		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
		(n=14)	(n=24)	
		n (%)	n (%)	
Hormon Reseptörü	Negatif	11 (%78,6)	13 (%54,2)	0,248
	Pozitif	3 (%21,4)	11 (%45,8)	
Metastaz Yeri	Kemik/Yumuşak Doku	7 (%50,0)	12 (%50,0)	1,000
	Visseral	7 (%50,0)	12 (%50,0)	

Yates Test

p95-HER2'ye göre hormon reseptörü ve metastaz yerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 7. p95-HER2'ye göre trastuzumab yanıtı ve sağkalımlar

		p95-HER2		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
		(n=14)	(n=24)	
		n (%)	n (%)	
Trastuzumab Yanıtı	Progresyon	5 (%35,7)	4 (%16,7)	0,245
	Kısmi Yanıt	8 (%57,1)	11 (%45,8)	0,737
	Tam Yanıt	1 (%7,1)	6 (25,0)	0,227
	Stabil Hastalık	0 (%0,0)	3 (%12,5)	0,283
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
^bGenel Sağkalım-1 (OS-1)		47,33±23,88 (44,32)	51,12±64,22 (30,37)	0,276
^bPFS		17,04±18,51 (11,16)	16,47±13,52 (12,37)	0,525
^bGenel Sağkalım-2 (OS-2)		30,75±20,76 (27,66)	26,18±15,80 (24,02)	0,555

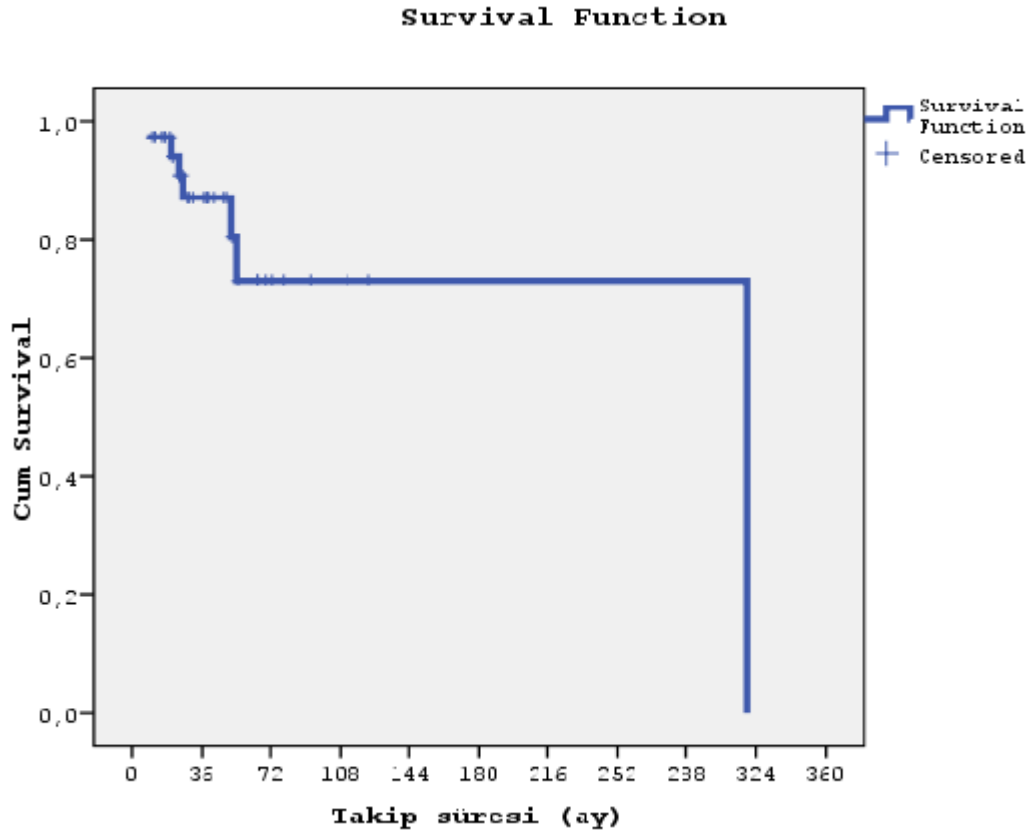
Fisher's Exact Test

^bMann Whitney U Test

p95-HER2'ye göre trastuzumab yanıt oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). P95'e ile OS-1 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). P95'e göre olguların PFS ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). P95 ile OS-2 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.1. Genel Sağkalım Analizi (OS-1)

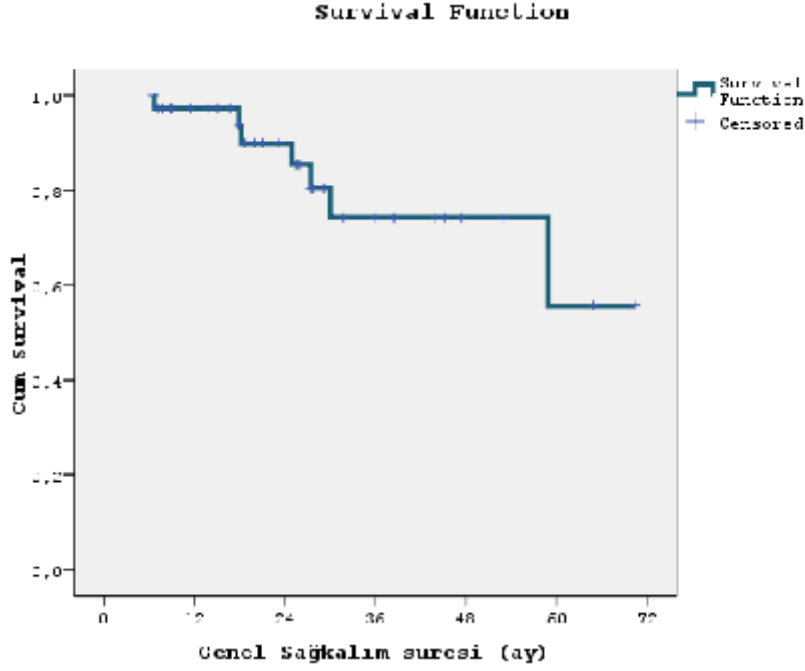
Toplam 38 MK olgusunda; 31 olgu yaşarken (%81,6); 7 ölüm gözlenmiştir. Ortalama sağkalım süresi $243,70 \pm 31,11$ aydır.



Şekil 7. Genel Sağkalım Eğrisi

4.2. Sağkalım Analizi (OS-2)

Toplam 38 MK olgusunda; 31 olgu yaşarken (%81,6); 7 ölüm gözlenmiştir. Ortalama sağkalım süresi $56,00 \pm 4,56$ aydır. En son ölüm 59. ayda görülmüştür.



Şekil 8. OS-2

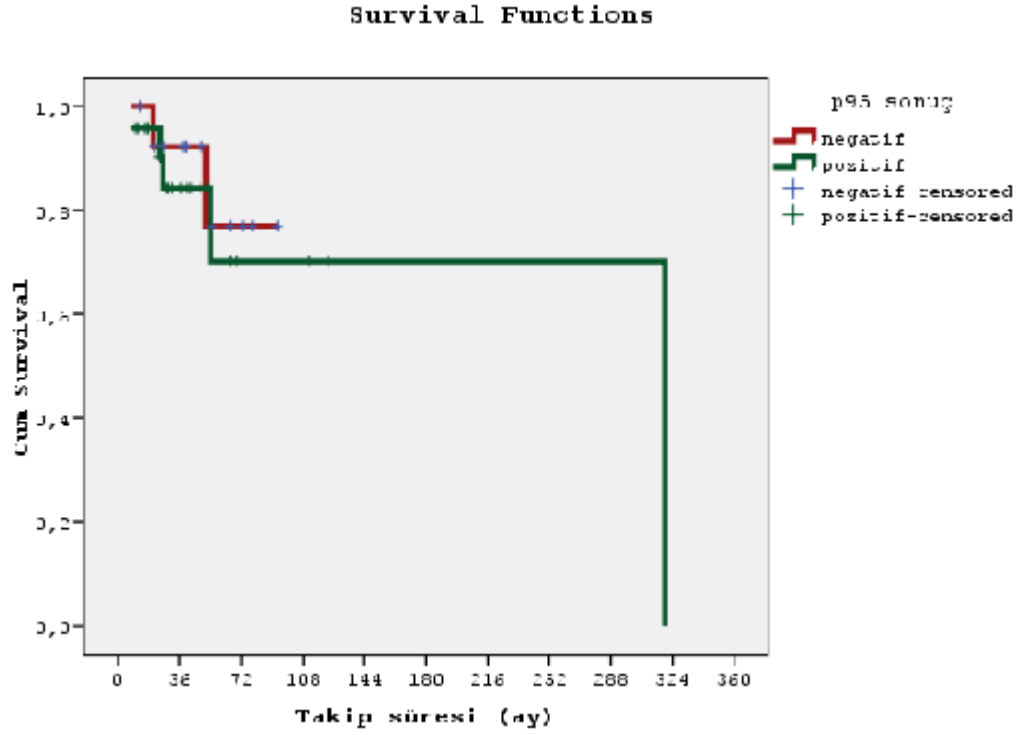
Tablo 8. p95-HER2'ye göre OS-1

P95	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım oranı	Ortalama Sağkalım Süresi
Pozitif	24	5	19	%79,2	235,06 \pm 45,04
Negatif	14	2	12	%85,7	81,12 \pm 7,61

Kaplan-Meier Analizi

P95 pozitif olgularda; 19 olgunun yaşadığı (%79,2); 5 ölümün gözlendiği; ortalama sağkalım süresinin $235,06 \pm 45,04$ ay olduğu anlaşılmaktadır. P95 negatif olgularda ise; 12 olgunun yaşadığı (%85,7); 2 ölümün gözlendiği; ortalama sağkalım

süresinin $81,12 \pm 7,61$ ay olduğu anlaşılmaktadır. p95 durumuna göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 10 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.672$; $p>0.05$).



Şekil 9. p95-HER2 Durumuna Göre Sağkalım Eğrisi

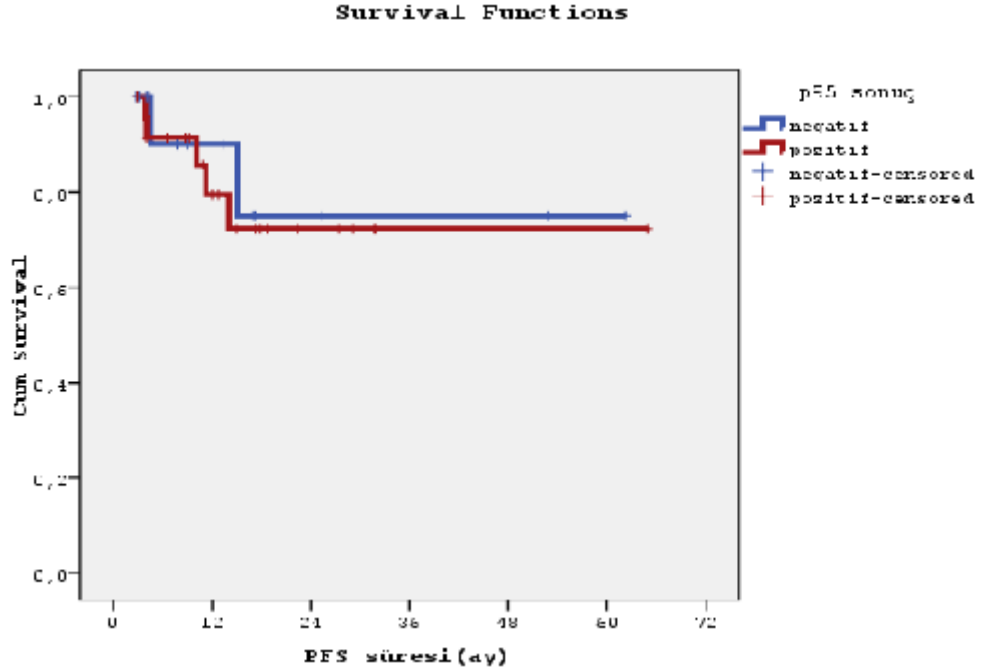
Tablo 9. p95-HER2'ye göre OS-2 analizi

p95-HER2	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi
Pozitif	2 4	5	19	%79,2	49,54±5,99
Negatif	1 4	2	12	%85,7	49,43±8,01

Kaplan-Meier Analizi

p95-HER2 pozitif olgularda; 19 olgunun yaşadığı (%79,2); 5 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $49,54 \pm 5,99$ ay olduğu anlaşılmaktadır. P95 negatif olgularda ise; 12 olgunun yaşadığı (%85,7); 2 ölümün gözleendiği; ortalama

sağkalım süresinin $49,43 \pm 8,01$ ay olduğu anlaşılmaktadır. P95 durumuna göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.738$; $p>0.05$).



Şekil 10. p95-HER2 Durumuna Göre OS-2 Eğrisi

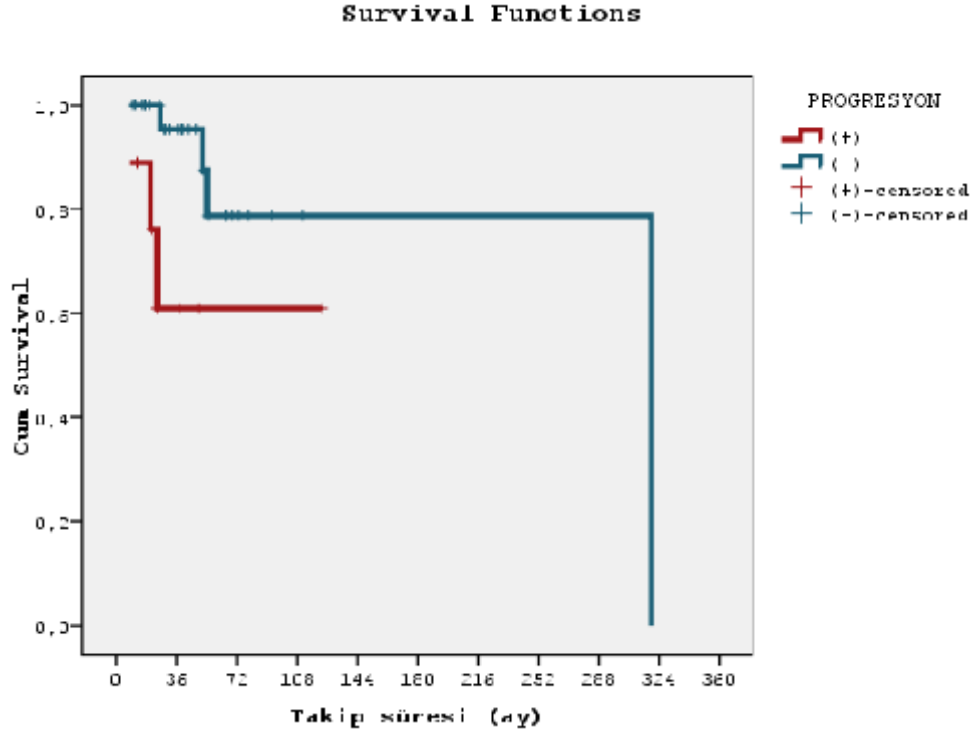
Tablo 10. Progresyona göre Sağkalım Analizi

Progresyon	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi
(+)	9	3	6	%66,7	82.01±18.73
(-)	29	4	25	%86,2	261.68±35.48

Kaplan-Meier Analizi

Progresyon görülen olgularda; 6 olgunun yaşadığı (%66,7); 3 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 82.01 ± 18.73 ay olduğu anlaşılmaktadır. Progresyon görülmeyen olgularda ise; 25 olgunun yaşadığı (%86,2); 4 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 261.68 ± 35.48 ay olduğu anlaşılmaktadır. Progresyon durumuna göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde

20 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.018; p<0.05).



Şekil 11. Progresyon Durumuna Göre Sağkalım Eğrisi

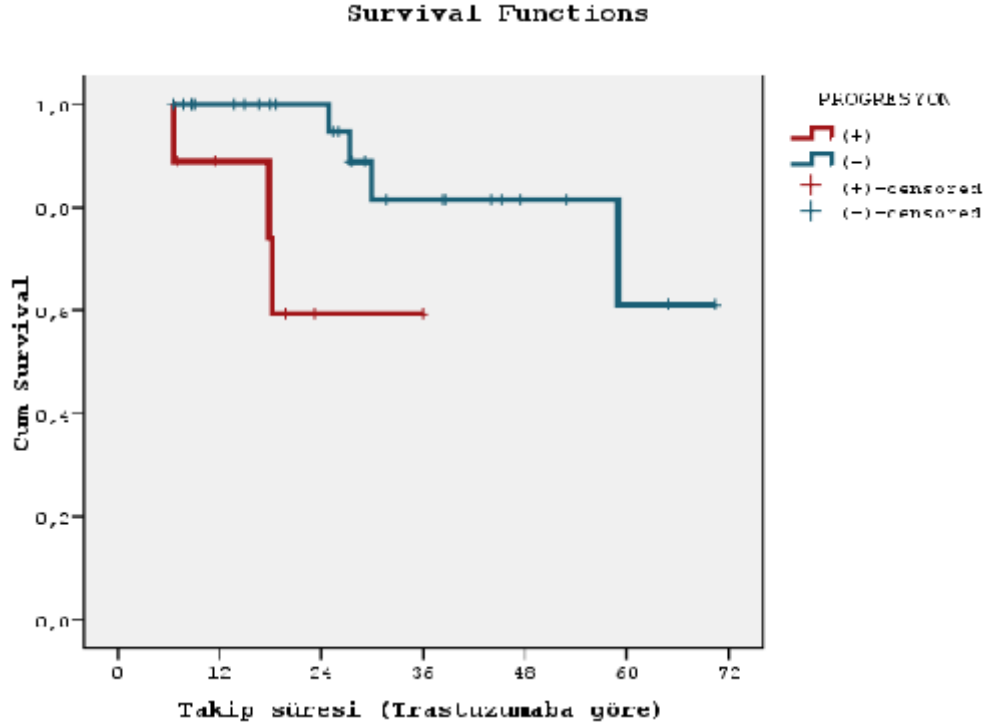
Tablo 11. Progresyona göre OS-2 analizi

Progresyon	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi
(+)	9	3	6	%66,7	27.83±3,93
(-)	29	4	25	%86,2	60.15±4.39

Kaplan-Meier Analizi

Progresyon görülen olgularda; 6 olgunun yaşadığı (%66,7); 3 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 27.83±3,93 ay olduğu anlaşılmaktadır. Progresyon görülmeyen olgularda ise; 25 olgunun yaşadığı (%86,2); 4 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 60.15±4.39 ay olduğu anlaşılmaktadır. Progresyon durumuna göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde

5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.010; p<0.05).



Şekil 12: Progresyon Durumuna Göre OS-2

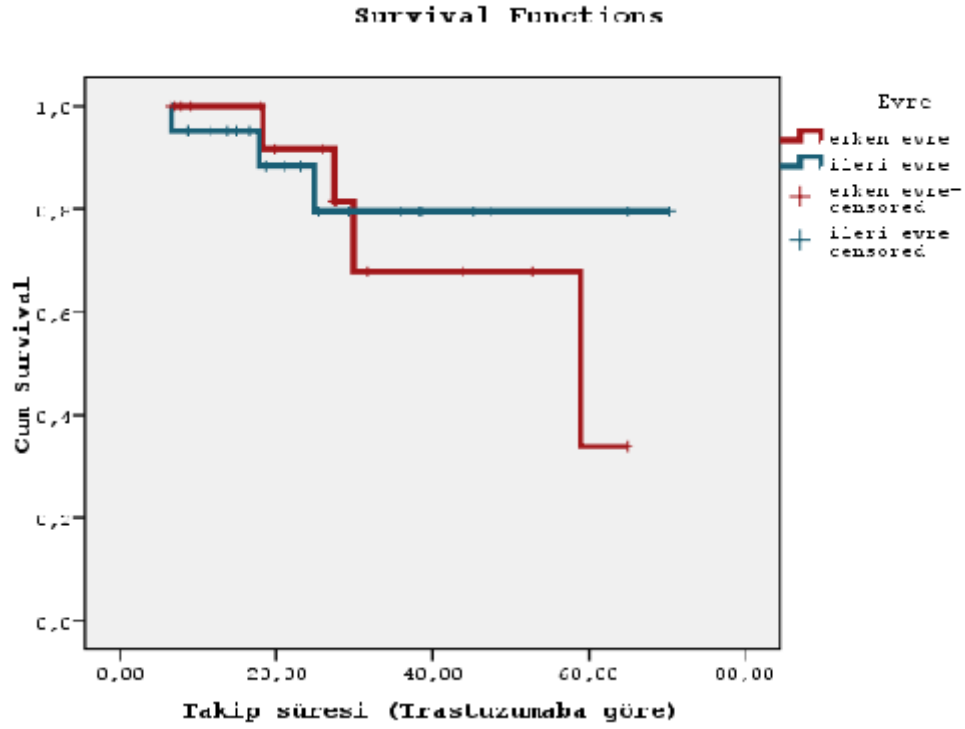
Tablo 12. Evrelere Göre OS-2 analizi

Evre	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi
Erken	17	4	13	%76,5	50.43±5,79
İleri	21	3	18	%85,7	59.78±5.59

Kaplan-Meier Analizi

Erken evrede 13 olgunun yaşadığı (%76,5); 4 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 50.43±5,79 ay olduğu anlaşılmaktadır. İleri evrede ise; 18 olgunun yaşadığı (%85,7); 3 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 59.78±5.59 ay olduğu anlaşılmaktadır. Evrelere göre sağkalım oranları Log Rank test

ile değerlendirildiğinde 5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.641$; $p>0.05$).



Şekil 13. Evrelere Göre OS-2 Eğrisi

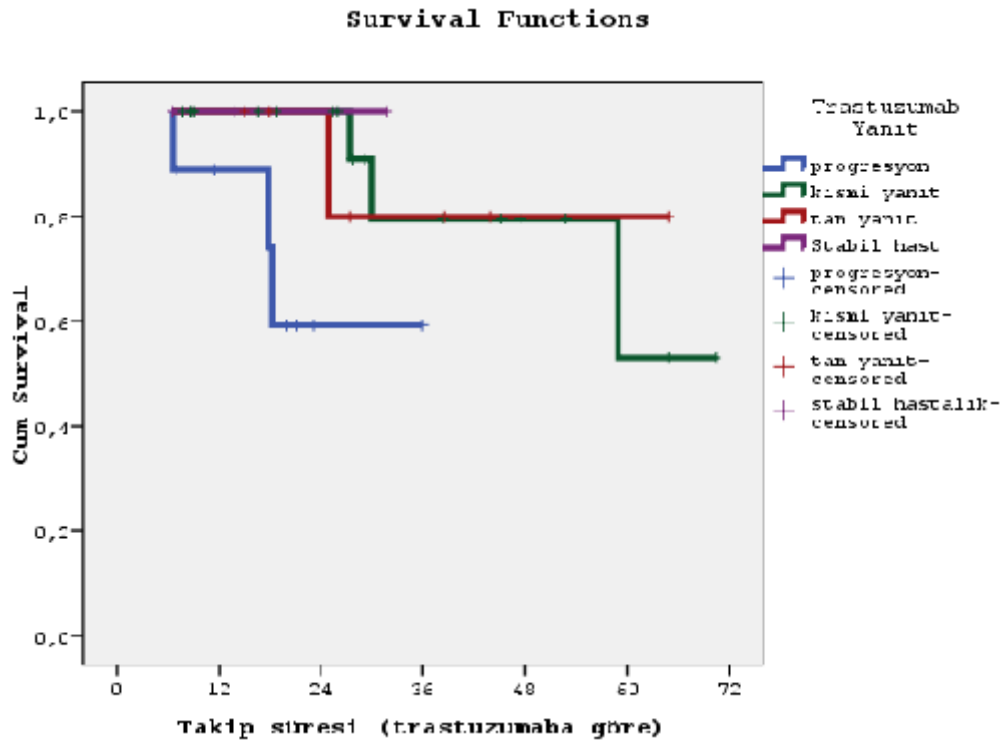
Tablo 13. Trastuzumab Yanıtına Göre Sağkalım Analizi

Trastuzumab	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi
Progresyon	9	3	6	66,7	27,38±3,91
Kısmi Yanıt	19	3	16	84,2	58,87±5,51
Tam Yanıt	7	1	6	85,7	56,92±7,17
Stabil Hastalık	3	0	3	100	17,31±12,97

Kaplan-Meier Analizi

Trastuzumab yanıtı progresyon olan 6 olgunun yaşadığı (%66,7); 3 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin 27,38±3,91 ay olduğu anlaşılmaktadır.

Kısmi yanıtta; 16 olgunun yaşadığı (%84,2); 3 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $58,87 \pm 5,51$ ay olduğu anlaşılmaktadır. Tam yanıt alınanlarda ise 3 olgunun yaşadığı (%85,7); 1 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $56,92 \pm 7,17$ ay olduğu anlaşılmaktadır. Stabil hastalık saptanan 3 olgunun hiçbirinde mortalite görülmemektedir. Trastuzumaba göre progresyon, kısmi yanıt ve tam yanıt gruplarının sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.046$; $p<0.05$). Progresyon olgularında sağkalım oranı anlamlı düzeyde düşüktür.



Şekil 14. Trastuzumab Yanıtına Göre OS-2 Eğrisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

MK dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen kanser tipidir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer almaktadır. Olguların büyük çoğunluğunda etyoloji bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel koşullar rol oynamakta ve çeşitli risk faktörleri tanımlanmaktadır. MK'ya spesifik HR ve HER2 reseptörünü hedef alan terapötik ajanların keşfi bu hedefleri taşıyan meme kanserli hastalarda tedavi başarısını arttırmıştır. HER2 amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonu yeni tanı MK hastalarında %20 oranında saptanmakta ve normal HER2 düzeyli hastalarla karşılaştırıldığında daha agresif klinik gidiş ve azalmış sağkalımla ilişkili bulunmaktadır (20). HER2'nin bir onkogen olarak meme kanserinde identifikasyonu hedefe yönelik tedavi stratejilerinin gelişimine olanak sağlamıştır. HER2'nin ekstraselüler domainine bağlanan Trastuzumab bir insan monoklonal antikorudur ve tek ajan olarak kullanıldığında klinik yanıt sağlamakta, kemoterapi ile kombine kullanımda sağkalımı uzatmakta ve HER2 aşırı eksprese tümörlerde adjuvan tedavide rekürrensi yaklaşık %50 oranında azaltmaktadır (21).

HER2 ekstraselüler domaininin proteolitik yıkımı antikor bazlı tedavilere direnç mekanizması olarak çalışılmaktadır. HER2 reseptörün NH₂-terminalinin kesilmiş formu olan p95-HER2, kinaz aktivitesine sahip olmasına karşın ekstraselüler domain ve trastuzumab bağlanma bölgesi yoktur. Literatür verilerine göre HER2 aşırı eksprese meme tümörlerinin yaklaşık olarak % 25'i reseptörün bu formunu eksprese etmektedir (63). p95-HER2 pozitifliğinin literatürle karşılaştırılınca belirgin daha yüksek bulunmasında çalışmanın immünohistokimyasal yöntemlerle yapılması veya hasta sayısının azlığı rol oynayabilir.

Trastuzumabın p185HER2 (full uzunlukta HER2) parçalanmasını ve sonuç olarak p95HER2 üretimini engellediği in vitro verilerle öne sürülse de retrospektif bir çalışma p95HER2 varlığı ile trastuzumab tedavisine klinik rezistans arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmıştır (29). Bu çalışmada 46 metastatik meme kanserli hastanın immünofloresans yöntemiyle p95HER2 düzeyi ölçülmüş ve p95HER2 ekspresyonu olan 9 hastadan sadece biri (%11.1) trastuzumaba yanıtlyken p185HER2

ekspresyonu olan 37 hastanın 19'unda (%51.4) trastuzumaba yanıt elde edilmiştir (36).

p95-HER-2'nin kantitatif yöntemlerle direk olarak tespit edildiği başka bir çalışmada yüksek p95-HER2 düzeyi ile daha kısa progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım arasında bir korelasyon olduğu saptanmıştır (64).

p95HER2'nin prognostik öneminin değerlendirildiği bir çalışmada p95HER-2 düzeyinin azalmış sağkalımda önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür. 5 yıllık hastaliksız sağkalım oranları yüksek düzeyde p95HER-2 ekspresyonu olan vakalarda daha düşük bulunmuştur. Primer meme kanserli 483 hastanın değerlendirildiği bu çalışmada hastaliksız sağkalım için medyan süre yüksek düzeyde p95HER-2 eksprese eden olgularda 32 ay iken düşük düzeyde ekspresyonu olan vakalarda 139 ay olarak saptanmıştır (63).

Western blot tekniği kullanılarak 337 MK dokusu ve 81 metastatik lenf nodunun p95-HER2 ve p185-HER2 düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmada nod pozitif hastaların nod negatif hastalardan daha yüksek oranda p95-HER2 eksprese etmekte olduğuna da işaret edilmiştir (35).

MK'da p95-HER2 varlığı yakın zamana kadar western blot analizi ile tespit edilebiliyordu (36). Bu teknikte büyük miktarda taze tümör dokusuna ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak klinik örneklerden nadiren uygun taze doku elde edilebilmesi nedeniyle bu yöntemin ciddi kısıtlamaları vardır. Bu sorunu çözmek için formalinle fikse parafin dokularda immünofloresans yöntemi ile bir çalışma tasarlanmıştır. Burada bu yöntemin pozitif prediktif değeri % 100, negatif prediktif değeri % 94 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda p95-HER2, olguların %36,8'inde negatif ve %63,2'sinde (n=24) pozitif saptanmıştır. p95 ile grade, tanı sırasındaki evre, hormon reseptörü durumu ve metastaz yerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ayrıca çalışmamızda p95-HER2 düzeyi ile hastaliksız sağkalım, genel sağkalım, trastuzumab yanıtları ve PFS arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu sonucu hasta sayımızın azlığına bağlayabileceğimiz gibi yöntem olarak IHC'nin kullanılmasının p95-Her2 saptanmasında yetersiz olduğu

düşünülebilir. IHC'nin p95-Her2 değerlendirilmesinde uygun bir yöntem olup olmadığını belirlemek için daha fazla hastanın alındığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6.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. Parkin DM. Epidemiology of cancer: global patterns and trends. *Toxicol. Lett.*, 1998;102-103:227-234.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 2004-2006 Yılları Türkiye Kanser İnsidansı.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005;5:74-108.
5. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. Asystematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1999; 8:843-854.
6. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000; 21:427-433.
7. Abeloff MD, Antonio CW, Weber BL, Tal ZZ, Sacchini V, McCormick B. Cancer of the Breast. Abeloff's Clinical Oncology, 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;33:631–641.
9. Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56 Suppl 1:21–26.
10. De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003;63:5236–5238.
11. Arpino G, Weiss H, Lee AV. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1254–1261.
12. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302:643–646.

13. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:2339–2347.
14. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:293–325.
15. Olivier M, Langerod A, Carrieri P. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1157–1167.
16. Rahko E, Blanco G, Bloigu R. Adverse outcome and resistance to adjuvant antiestrogen therapy in node-positive postmenopausal breast cancer patients: The role of p53. *Breast* 2006;15:69–75.
17. Berns EM, Foekens JA, Vossen R. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:2155–2162.
18. Sergina NV, Rausch M, Wang D. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445: 437–441.
19. Resistance to Trastuzumab in Breast. Paula R. Pohlmann, Ingrid A. Mayer and Ray Mernaugh *Clin Cancer Res* 2009;15:7479-7491.
20. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN. 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;25:118–145.
21. Smith I, Procter M, Gelber RD. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369: 29–36.
22. Bachman KE, Argani P, Samuels Y. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004;3:772–775.
23. Puc J, Keniry M, Li HS. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 2005;7:193–204.
24. Nagata Y, Lan KH, Zhou X. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117–127.

25. Saal LH, Holm K, Maurer M. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2554-9.
26. Baselga J, Albanell J, Molina MA, Arribas J. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 2001;28:4-11.
27. Agus DB, Akita RW, Fox WD. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2002;2:127-37.
28. Wehrman TS, Raab WJ, Casipit CL, Doyonnas R, Pomerantz JH, Blau HM. A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19063-8.
29. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:4744-9.
30. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an antiangiogenic cocktail. *Nature* 2002;416:279-80.
31. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivocytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6:443-6.
32. Spiridon CI, Guinn S, Vitetta ES. A comparison of the in vitro and in vivo activities of IgG and F (ab')₂ fragments of a mixture of three monoclonal anti-Her-2 antibodies. *Clin Cancer Res* 2004;10:3542-51.
33. Musolino A, Naldi N, Bortesi B. 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.
34. Petkova SB, Akilesh S, Sproule TJ. Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model:

potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int Immunol* 2006;18:1759–69.

35. Molina MA, Saez R, Ramsey EE. 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.
36. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A. 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.
37. Bruno R, Washington CB, Lu J-F, Lieberman G, Banken L, Klein P. Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients With HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:361–9.
38. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J. 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.
39. Lennon S, Barton C, Banken L. 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.
40. Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M, Jepson S, Perez A, Carraway CA. Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:323–37.
41. Nagy P, Friedlander E, Tanner M. 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.
42. Bourguignon LY, Zhu H, Zhou B, Diedrich F, Singleton PA, Hung MC. Hyaluronan promotes CD44v3–2 interaction with Grb2–185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *J Biol Chem* 2001;276:48679–92.

43. Palyi-Krekk Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szollosi 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.
44. Pandolfi PP. Breast cancer-loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med* 2004;351:2337–8.
45. Philp AJ, Campbell IG, Leet C. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85 $\{\alpha\}$ gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 2001;61:7426–9.
46. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007;12:395–402.
47. 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.
48. Brugge J, Hung M-C, Mills GB. A new mutational activation in the PI3K Pathway. *Cancer Cell* 2007;12:104–7.
49. Tseng P-H, Wang Y-C, Weng S-C. 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.
50. Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:11118–28.
51. 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.

52. Harris LN, You F, Schnitt SJ. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1198–207.
53. 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.
54. Tzahar E, Waterman H, Chen X. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:5276–87.
55. Arteaga CL, O'Neill A, Moulder SL. 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
56. Geyer CE, Forster J, Lindquist D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733–43.
57. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL. C Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:1471–7.
58. Tripathy D, Mukhopadhyay P, Verma U. Targeting of the chemokine receptor CXCR4 in acquired trastuzumab resistance [Abstract306]. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106:S32.
59. Huang C, Gee J, Nicholson R, Osborne K, Schiff R. $\alpha_6\beta_1$ and $\alpha_6\beta_4$ integrins and their critical role in promoting resistance to multiple treatment strategies for breast cancer.
60. Shields RL, Namenuk AK, Hong K. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, FcRn and design of IgG1

variants with improved binding to the Fc γ R. *J Biol Chem* 2001;276:6591–604.

61. Lazar GA, Dang W, Karki S. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4005–10.
62. Gearing AJH, Thorpe SJ, Miller K. Selective cleavage of human IgG by the matrix metalloproteinases, matrilysin and stromelysin. *Immunol Lett* 2002;81:41–8.
63. Saez R, Molina MA, Ramsey EE. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER2–positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:424–431.
64. Sperinde J, Jin X, Banerjee J. 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 Aug 15;16(16):4226-35.