

Diplomarbeit

Zelluläre Wirkmechanismen von HER-2/neu und mögliche Ansatzpunkte für eine verbesserte Prädiktion einer anti-HER-2/neu Therapie beim Mammakarzinom und Magenkarzinom

eingereicht von

Alexandra Elisabeth Meierhofer

Mat.Nr.: 0311295

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie

unter der Anleitung von

ao.Univ.-Prof. Dr.med.univ. Peter Regitnig

Ort, Datum:.....

Unterschrift:

Eidesstattliche Erklärung

Bei meiner Ehre und mit reinem Gewissen erkläre ich, Alexandra Elisabeth Meierhofer, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am..... Unterschrift:

Einleitung

Trotz umfangreicher molekularbiologischer Forschung auf dem Gebiet der Rezeptortyrosinkinasen und der zellulären Wirkmechanismen gibt es derzeit noch kein Testverfahren, welches das Ansprechen von Mamma- und Magenkarzinomen auf eine Antikörpertherapie absolut zuverlässig vorhersagt.

15-20% aller Mammakarzinome und ungefähr 20% aller Magenkarzinome zeigen eine HER-2/neu Überexpression an der Tumorzelloberfläche. Dies ist durch eine Genamplifikation des HER-2/neu Gens bedingt. Diese führt zu einer Überexpression, welche mittels Immunhistochemie nachgewiesen wird. Die Genamplifikation (in vivo Vermehrung von DNA-Abschnitten) wird mittels in-situ-Hybridisierungsverfahren nachgewiesen. Trotz der guten Etablierung dieser Methoden in der klinischen Pathologie ist es bisher nicht exakt möglich Vorherzusagen, ob Patientinnen mit HER-2 Positivität tatsächlich auf eine Antikörpertherapie ansprechen werden. Die Ursache für ein fehlendes Ansprechen liegt im komplexen zellulären Wirkmechanismus von HER-2 und den nachfolgenden zellulären Prozessen, wobei zahlreiche individuelle Einflußfaktoren bestehen: z.B. Dimerisierungspartner des HER-2 Rezeptors, Mutation von *PTEN* oder PI3K.

Ziel dieser Arbeit: Erarbeitung der HER-2/neu Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene, Darstellung der Pathways und Interaktionen mit anderen Rezeptortyrosinkinasen. Ableitung möglicher Ansatzpunkte für prädiktive Tests.

Dies ist von Bedeutung, weil die HER-2/neu Testung derzeit immunhitochemisch und/oder mittels in-situ Hybridisierung erfolgt und hinsichtlich der Therapie des Mammakarzinoms und des Magenkarzinoms die maßgebliche Entscheidungshilfe darstellen. Trotz der gut etablierten Tests sprechen nur ca. 40-50% der Patientinnen auf die Antikörpertherapie mit Trastuzumab (targeted-therapy) an. Ein verbesserter Testansatz, welcher aber die Kenntnis des komplexen Wirkmechanismus voraussetzt, ist theoretisch zu erarbeiten. Wenn der Primärtumor eine HER-2 Genamplifikation und eine HER-2 Überexpression des Proteins aufweist, therapiert man derzeit mit Trastuzumab. (Di Cristofano A, 1998)

Die HER-2 Genamplifikation ist sicher ein notwendiger Biomarker, aber nicht ausreichend genug um die Wirksamkeit von Trastuzumab vorherzusagen. (Fujita T, 2006)

Die Forschungsergebnisse sind für Frauen (hohe Inzidenz des Mammakarzinoms; Magenkarzinome) und Männern (Magenkarzinom) gleichermaßen von Bedeutung.

Danksagung

Mein allererster und gleichzeitig großer Dank gilt meinem Betreuer ao. Univ.-Prof. Dr.med.univ. Peter Regitnig, für seine große Unterstützung, seine Geduld und für sein immerwährendes Verständnis auch über die Arbeit hinaus.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem lieben Vater bedanken, der mich gerade am Anfang meines Studiums zum Durchhalten ermutigt hat und der mir immer liebevoll zur Seite stand.

Ebenso bei meiner lieben Oma, die mich immer unterstützt und aufgemuntert hat. Gerne wollte sie meinen Studienabschluss noch erleben, was ihr leider nicht vergönnt war. Meiner Großmutter danke ich ganz besonders für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonderen Dank gilt meinen Tanten Friederike und Johanna, welche immer für mich da waren und mich motiviert haben.

Mein weiterer Dank gilt meiner besten Freundin Christina, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich seit Jahren auf meinem Lebensweg begleitet. Danke auch meinem guten Freund Florian, der es immer wieder verstand mich in schwierigen Situationen zu trösten.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Freunden während meiner Studienzeit, vor allem bei Peter T., für das fröhliche Miteinander in Graz und darüber hinaus.

Letztendlich möchte ich mich auch bei meiner lieben Mutter, welche an den Folgen einer dieser Erkrankungen allzu früh verstorben ist, bedanken. Ihr früher Tod hat mich in der Wahl des Medizinstudiums bestärkt.

Zusammenfassung

Hintergrund: In etwa 15-20% der Mammakarzinome und circa 20% aller Magenkarzinome kommt es zu einer HER-2 Überexpression an der Tumoroberfläche. Bis heute gibt es noch kein gesichertes Testverfahren, welches das Ansprechen von Mamma- und Magenkarzinomen auf eine Antikörpertherapie zuverlässig vorhersagt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Suche nach verbesserten Testansätzen bezüglich des Ansprechens auf Trastuzumab (monoklonaler Antikörper) oder vergleichbarer Therapeutika. Die möglichen erarbeiteten Ansätze werden theoretisch in der folgenden Arbeit dargestellt.

Methoden: Diese Arbeit wurde unter Einbeziehung literarischer Quellen und aufgrund wissenschaftlicher Erkenntnisse erstellt. Der zelluläre Wirkmechanismus von HER-2 und die daraus resultierenden Prozesse unter Berücksichtigung verschiedener Einflussfaktoren sowie die Wirkmechanismen von anti-HER-2 Therapeutika werden dargestellt.

Resultate: Mögliche Ansatzpunkte fanden sich, zum Beispiel, an der Membran (Homodimere versus Heterodimere, MUC4), im Zytoplasma, an den Liganden (EGF, TGF- α) oder an den Wachstumsinhibitoren-CDK's (p21, p27).

Schlussfolgerung: Es fanden sich einige mögliche Ansatzpunkte, welche man in Zukunft berücksichtigen könnte um das Ansprechen der Patientinnen auf eine Antikörpertherapie besser vorherzusagen. Jedoch bedarf dies noch intensiverer experimenteller Forschung und Validierung, da die folgenden Punkte nur theoretisch erarbeitet wurden.

Schlüsselwörter: HER-2/neu Pathway, Trastuzumab, Tyrosinkinase, Testmethoden

Abstract

Background: An overexpression of HER-2 on the tumor cell surface is found in approximately 15-20% of breast carcinomas and 20% of gastric carcinomas. To date, there is no established test method, which reliably predicts the response of breast and gastric cancer concerning an antibody therapy. This study deals with the search for improved approaches to test the response to Trastuzumab (monoclonal antibody) or comparable therapies. Possible theoretical approaches developed are presented in the following work.

Methods: This work was created using literary sources, based on scientific evidence. The cellular mechanism of action of HER-2 and the resulting processes are presented in consideration of various factors. Also the mechanisms of action of anti-HER-2-therapeutics are shown.

Results: Possible approaches could be, for example, at the cell membrane (Homodimere versus Heterodimere, MUC4), in the cytoplasm, to the ligands (EGFR, TGF- α) or to the CDK-growth-inhibitors (p21, p27).

Conclusion: Several possible approaches could be considered to more effectively predict patient response to an antibody therapy. However, intensive experimental studies and validation of these results are still required, since the following points were achieved in theory.

Keywords: HER-2/neu pathway, Trastuzumab, tyrosine kinase, test methods

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	II
DANKSAGUNG	IV
ZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VII
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
1 BEDEUTUNG VON HER-2/NEU BEI MAMMA- UND MAGENKARZINOM	1
2 FUNKTION DER TYROSINKINASE BZW. DES TYROSINKINASEREZEPTORS	3
3 FUNKTION DER HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) FAMILIE, DIMERISIERUNGSPARTNER UND LIGANDEN	4
3.1 HER-1	4
3.2 HER-3	4
3.3 HER-4	5
3.4 HER-Liganden	5
3.5 Homodimere versus Heterodimere	7
4 HER-2 DOWNSTREAM PATHWAYS UND UNMITTELBARE HER-2 EINFLUßFAKTOREN	11
5 WIRKMECHANISMEN VON ANTI-HER-2 THERAPEUTIKA	18
5.1 Trastuzumab	18

5.2	T-DM1	19
5.3	Pertuzumab	21
5.4	Lapatinib	22
5.5	Cetuximab	22
5.6	Pantimumab	23
6	URSACHEN FÜR RESISTENZ VON TRASTUZUMAB	25
6.1	PTEN Verlust	25
6.2	Aktivierung alternativer Möglichkeiten	25
6.3	Expression von Liganden der EGF/EGFR Familie	26
6.4	Rezeptor Maskierung oder Epitop Unzugänglichkeit	26
7	MÖGLICHE STRATEGIEN ZUR ÜBERWINDUNG DER RESISTENZ	27
8	DERZEITIGE TESTMETHODEN	29
8.1	HER-2 Positivität	30
8.2	Fragliche HER-2 Ergebnisse	30
8.3	HER-2 Negativität	31
8.4	HercepTest	32
8.5	Prinzip des HER-2 Immunscoreings beim Magenkarzinom	34
8.6	HER-2 Testung beim Magenkarzinom mittels ISH	34
8.7	Immunoscoreing beim Magenkarzinom	35
8.8	ISH Analyse	35
9	MÖGLICHE ANSATZPUNKTE FÜR EINE VERBESSERTE HER-2 PRÄDIKTION	38
9.1	An der Membran	38

9.2	Liganden	39
9.3	HER-2 als immunologischer Angriffspunkt	40
9.4	Im Zytoplasma	40
9.5	Wachstumshinhibitoren-CDK`s	41
9.6	Andere Wachstumsfaktoren	43
	LITERATURVERZEICHNIS	45

Glossar und Abkürzungen

(entsprechend HUGO Nomenclature Committee)

ABL	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
ADC	antibody-drug conjugate
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AKT/AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
AR	Androgene receptor
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
bzw.	beziehungsweise
CAP	College of American Pathologists
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A SYN: Waf1, p21
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1, p27Kip1)
c-fos/FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CISH	Chromogenic in situ Hybridisation
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
DM	Drug Maytansinoid
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
FAK	protein tyrosine kinase 2
FDA	Food and Drug Administration
EGFR	epidermal growth factor receptor
Elk1	Member of ETS oncogene family
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ETS	E-twenty-six Familie
FEC	5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid
FISH	Fluorescence in situ Hybridisation
FOXO1a	Forkhead box O1
FOXO3a	Forkhead box O3
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
GRB 2	growth factor receptor-bound protein 2

GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
Hb-EGF	heparin binding-EGF
HER	humaner epidermaler Rezeptor
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IgG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1)
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MEK2)
MLPA	Multiplex Ligation-dependent probe Amplification
MUC4	Mucin 4, cell surface associated
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
pCR	pathologische Komplettremission
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIK3CA	Phosphoinositol-3-Kinase, catalytic, alpha
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 Biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat
PHLPP	PH domain leucin-rich repeat protein phosphatase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog (Tumorsupressorprotein)
RAF	rat fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RBD	Ras-bindende Domäne
SHC	transforming protein 1
SH2-Domäne	src-homology 2
SH3-Domäne	src-homology 3
SOS	Son of sevenless homolog
SRC	Schmidt-Ruppin A-2 (viral oncogene homolog)
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5A
STK11	serine/threonine kinase 11
TCF	tenary complex factor
TGF-Alpha	Transforming Growth Factor- Alpha
T-DM1	Trastuzumab-Maytansine Konjugat 1
TK	Tyrosinkinase

ToGA	Trastuzumab on Gastric Cancer (Phase III Studie)
TSC1	tuberous sclerosis protein 1
TSC2	tuberous sclerosis protein 2
TTP	Time to Progression
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WAF1	cyclin-depentend kinase inhibitor 1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ERBB-Signaling Pathway, <i>übernommen von:</i> http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?hsa04012+2064 , <i>bezogen am</i> <i>28.12.2010</i>	9
Abbildung 2: Pathways in Cancer, <i>übernommen</i> <i>von:</i> http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?hsa05200+2064 , <i>bezogen</i> <i>am 27.05.2011</i>	10
Abbildung 3: Neo-ALTTO Therapieschema, <i>übernommen</i> <i>von:</i> http://www.germanbreastgroup.de/studien/neoadjuvant/neo-altto/english- summary-.html , <i>bezogen am 06.06.2011</i>	28
Abbildung 4: Algorithmus für IHC, <i>übernommen von:</i> http://jco.ascopubs.org/content/25/1/118.long , <i>bezogen am 06.06.2011</i>	31
Abbildung 5: Algorithmus für FISH, <i>übernommen von:</i> http://jco.ascopubs.org/content/25/1/118.long , <i>bezogen am 06.06.2011</i>	32
Abbildung 6: Dimere, <i>übernommen von:</i> http://www.genome.jp/dbget- bin/show_pathway?hsa04012+2064 , <i>bezogen am 28.12.2010</i>	38
Abbildung 7: Liganden, <i>übernommen von:</i> http://www.genome.jp/dbget- bin/show_pathway?hsa04012+2064 , <i>bezogen am 28.12.2010</i>	39
Abbildung 8: Wachstumsfaktoren, <i>übernommen von:</i> http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?hsa04012+2064 , <i>bezogen am</i> <i>28.12.2010</i>	41
Abbildung 9: PTEN-Einfluss, <i>übernommen von:</i> http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?hsa05200+2064 , <i>bezogen am</i> <i>27.05.2011</i>	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien für die Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung von HER-2 an der Zellmembran, *erstellt von Alexandra Meierhofer*.....33

Tabelle 2: Modifiziertes HER-2 Immuno-Scoring beim Mammakarzinom, *übernommen von: http://www.bv-pathologie.de/dokumente/prof_rueschoff_vortrag.pdf, bezogen am 25.07.2010*...37

1 Bedeutung von HER-2/neu bei Mamma- und Magenkarzinom

HER-2/neu, auch bekannt als erb-B2 oder kurz HER-2, ist ein Mitglied der ErbB-Familie und steht für **human epidermal growth factor receptor 2**. Die ErbB-Familie ist eine Untergruppe von Rezeptor-Tyrosinkinase. (Hudis CA, 2007; Olayioye MA e. a., 2001)

Der Zusatz „neu“ leitet sich von der ursprünglichen Bezeichnung des Proteins neuro-/glioblastoma derived oncogene homolog 2 ab. Das HER-2 Protein wurde erstmals 1986 von Akiyama et al. beschrieben. (Akiyama T, 1986)

Dieses Protein hat keinen eigenen Liganden und ist nicht in der Lage Wachstumsfaktoren zu binden. Durch Bindung von HER-2 an andere Liganden-gebundene EGF Rezeptoren, kommt es zu Bildung von Heterodimeren. Diese Heterodimere spielen eine wichtige Rolle im mitogen-activated kinase pathway (MAPK) und im Phosphatidylinositol-3 kinase pathway (PI3K). Eine Genamplifikation und/oder eine Überexpression von HER-2/neu, spielen sowohl beim Mamma- als auch in anderen Karzinomen eine Rolle. (NCBI Gene)

Die EGFR Familie besteht aus 4 verwandten Rezeptoren: c-erb-B1 oder EGFR, c-erb-B2 oder HER-2, c-erb-B3 oder HER-3 und c-erb-B4 oder HER-4. *HER-2* spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des normalen Zellwachstums wie auch Zellwachstum von Karzinomzellen und in der Behandlung von gewissen malignen Tumorerkrankungen, insbesondere des Mammakarzinoms und des Magenkarzinoms. Diese 4 Rezeptoren weisen einen hohen Grad an Ähnlichkeit im Bezug auf die Domäne der Tyrosinkinase auf. (Klapper LN, 1999) Slamon et al. beschrieben 1987 eine HER-2 Überexpression in circa 30% aller Mammakarzinome (Slamon DJ C. G., 1987), wobei dies auf eine HER2-Genamplifikation zurückzuführen ist. (Seshadri R., 1993) Im Fall einer HER2 Überexpression ist es möglich Patientinnen mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Trastuzumab, anti-HER2 humaner monoklonaler Antikörper) zu therapieren.

Hinsichtlich der Therapiemöglichkeiten des Magenkarzinoms sind die positiven Erkenntnisse der rezenten Phase III ToGA-Studien zu beachten. Eine Addition von Trastuzumab zur Standardchemotherapie führt laut einer Studie von Bang et al. zu

einer signifikanten Verlängerung der medianen Überlebenszeit bei HER-2 positiven fortgeschrittenen Magenkarzinomen. (Bang JI, 2010)

Weiters kann eine HER2 Überexpression bei fortgeschrittenem nicht kleinzelligem Lungenkarzinom, bei Endometriumkarzinom und bei kolorektalem Karzinom, sowie auch bei anderen epithelialen Tumoren beobachtet werden. Für diese Tumorentitäten gibt es bisher allerdings keine ausreichenden klinischen Studien und keine etablierten Therapieschemata.

2 Funktion der Tyrosinkinase bzw. des Tyrosinkinaserzeptors

Die Tyrosinkinase ist ein Protein, das zu den Proteinkinasen zählt. Es werden ca. 90 Tyrosinkinasen im menschlichen Genom kodiert, 58 davon als Rezeptor-Tyrosinkinasen. Ihre Funktion ist das reversible Anhängen einer Phosphatgruppe (Phosphorylierung) auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins, welches auf diese Weise aktiviert wird. Eine Rezeptor-Tyrosinkinase kann durch Rezeptor Liganden oder durch Mutationen aktiviert werden. Eine weitere Möglichkeit Tyrosinkinasen zu aktivieren ist die Überexpression, bedingt etwa durch Genamplifikation. Bei Karzinomen ist dies vor allem für den epidermal growth factor-Rezeptor (EGFR) und für HER-2 von großer Bedeutung. Liganden, welche entweder in der Tumorzelle selbst oder im umliegenden Stroma überexprimiert werden, können auch zu einer Aktivierung eines Tyrosinkinaserzeptors führen. Der Tyrosinkinaserzeptor empfängt hauptsächlich Signale von Wachstumsfaktoren und spielt so eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung und in der Zellproliferation: Eine gesteigerte Rezeptor-Tyrosinkinasen Aktivität führt aber auch zu Erkrankungen mit unkontrolliertem Wachstum, wie zum Beispiel Karzinomen. (Robinson DR, 2000)

Da Rezeptor-Tyrosinkinasen in zahlreichen Malignomen eine zentrale Rolle spielen, wird versucht diese pharmakologisch zu hemmen. Mögliche Ansatzpunkte sind Antikörper gegen den Rezeptor, Antikörper gegen Liganden und kleine, die Adenosintriphosphat-Bindung (ATP)-Bindung hemmende Moleküle. (Müller-Tidow C, 2007) Tyrosinkinaseinhibitoren sind Medikamente, welche gezielt in den Tumorstoffwechsel eingreifen und den Signaltransduktionsweg beeinflussen, bekannt als „targeted therapy“. (Caspari H, 2008)

3 Funktion der human epidermal growth factor receptor (EGFR) Familie, Dimerisierungspartner und Liganden

Die EGFR oder auch HER-Familie besteht aus 4 strukturell ähnlichen Subtypen: HER-1 (EGFR), HER-2, HER-3 und HER-4. Diese Rezeptoren befinden sich an der Zelloberfläche. Jeder Rezeptor besitzt eine intra-, extrazelluläre und transmembranöse Domäne. Der extrazelluläre Teil ist mit Ausnahme von HER-2, in der Lage Liganden zu binden (Burgess AW, 2003), während der intrazelluläre Teil, mit Ausnahme von HER-3, die Domäne der Tyrosinkinase enthält. (Olayioye MA, 2000).

3.1 HER-1

HER-1 oder Synonym EGFR (Epidermaler Growth Factor Receptor) ist durch seine Tyrosinkinaseaktivität gekennzeichnet und spielt eine entscheidende Rolle in der normalen Zellfunktion wie auch in der Funktion von Krebszellen. Zu einer EGFR Überexpression kommt es bei einer Vielzahl von Tumoren, wie z.B. bei einem Teil der Bronchial-, Prostata-, Ovarial-, Blasen-, Nieren- oder Pankreaskarzinome. (Martinelli E, 2009)

Der HER-2 Rezeptor verfügt über ein besonders hohes Dimerisierungspotential mit EGFR und ist der bevorzugte Dimerisationspartner. (Sliwkowski MX, 2004)

3.2 HER-3

HER-3 ist ein membrangebundenes Protein mit einer Bindungsstelle für Neuregulin. Da es keine aktive Kinase Domäne besitzt, ist es nicht in der Lage, die Konduktion selbst einzuleiten. (NCBI Gene) HER-3 ist in der Lage mit anderen Rezeptoren, besonders mit HER-2, zu dimerisieren. Eine erhöhte Expression von HER-3 führt zu einer erhöhten Signalwirkung von HER-2, während eine verminderte Expression von HER-3 zu einem Verlust der HER-2 Aktivität führt. (Sliwkowski MX, 2004) HER-3 ermöglicht HER-2 den PI3K Pathway zu aktivieren.

3.3 HER-4

HER-4 verfügt sowohl über eine Liganden-bindende Domäne als auch über eine Tyrosinkinase-domäne. Laut einer vorklinischen Studie von Campiglio et al. nimmt man an, dass HER-3/HER-4 Heterodimere für eine anhaltende Aktivierung des MAPK verantwortlich sein könnten. Es werden jedoch weitere Studien benötigt um die Rolle von HER-4 genauer zu charakterisieren. Bei der Entstehung von Karzinomen dürfte HER-4 jedoch eine geringere Rolle, verglichen mit den anderen HER-Mitgliedern, spielen. (Campiglio M, 1999)

3.4 HER-Liganden

Liganden sind Moleküle, welche an Rezeptoren binden. Vor allem binden sich kleinere Moleküle an größere um einen biologischen Vorgang auszulösen.

Bei den HER-Liganden bindet ein Molekül außerhalb der Zelle an die extrazelluläre Domäne des HER-Rezeptors. (Burgess AW, 2003) Durch die Ligandenbindung kommt es zu Veränderungen der Konformation der Rezeptoren der HER-Familie. (Sliwkowski MX, 2004) Dies wiederum ermöglicht den Rezeptoren sich mit anderen Rezeptoren der HER-Familie zu verbinden, was als Dimerisation bezeichnet wird. Außerdem wird durch Transphosphorylierung die intrazelluläre Tyrosinkinase des dimerisierten Rezeptors aktiviert. (Burgess AW, 2003)

Unterschiedliche Liganden binden an die verschiedenen HER Rezeptoren, wobei für HER-2 kein Ligand bekannt ist. (Burgess AW, 2003)

Liganden stimulieren normalerweise das Wachstum, wie zum Beispiel während der Embryonalentwicklung. (Sliwkowski MX, 2004) An EGFR binden selektive Liganden. Hierbei sind EGF und der transforming growth factor- α (TGF- α) oder auch Amphiregulin oder Neuregulin die aktivierenden Liganden. (Martinelli E, 2009) Das *EGF* Gen ist auf Chromosom 4 lokalisiert. (Osborne CK, 1980) EGF ist ein glykosyliertes Protein, welches biologisch aktiv ist und den EGF Rezeptor aktivieren kann. Es stimuliert das Wachstum normaler als auch transformierter Brustdrüsenzellen. (Mroczkowski B, 1989)

EGF-mRNA wurde in 83% der Mammakarzinome, das EGF Protein wurde in 15-30% der Mammakarzinome gefunden. (Braun S, 2000; Gebauer G, 2001)

Der TGF- α wurde erstmals in Virus-transformierten Zellen und später in menschlichen Tumorzellen entdeckt. Er ist in 42% homolog mit dem EGF. Seine Tertiärstruktur ist ident mit EGF und ist in der Lage den EGF Rezeptor mit der gleichen Affinität zu binden. Die Mehrheit der Karzinome, welche höhere Level von TGF- α exprimieren, exprimieren auch höhere Level des EGF Rezeptors. Dies wird auf eine autokrine Stimulation zurückgeführt. (Braun S, 2000; Gebauer G, 2001)

Amphiregulin ist ein Glycoprotein, welches EGF strukturell ähnlich ist. Jedoch ist seine Affinität zum EGF-Rezeptor geringer, als die von TGF- α und EGF. Obwohl gezeigt wurde, dass Amphiregulin das Wachstum einiger Zelllinien hemmen kann, gibt es auch Hinweise auf eine autokrine Funktion. Östrogen-Rezeptor positive Zellen exprimieren generell mehr Amphiregulin verglichen mit Östrogen-negativen Zellen. Östrogen induziert die Expression vom Amphiregulin mRNA. (Braun S, 2000)

Weitere Liganden von HER-4 sind, unter anderem, Heregulin, Neuregulin, Betacellulin und Epiregulin. Neuregulin und Heregulin können auch an HER-3 binden.

Neureguline bestehen aus 4 strukturell ähnlichen Proteinen, welche zur EGF-Familie gehören. Zu dieser Familie gehört auch Heregulin. (Vartanian T, 1999)

Neuregulin-1 besteht aus folgenden Untergruppen:

- Typ I Neuregulin: Heregulin, NEU differentiation factor oder Acetylcholinrezeptor-Synthese-Stimulator
- Typ II Neuregulin: Glial growth factor-2
- Typ III Neuregulin: Sensory and motoneuron derived-factor
- Typ IV Neuregulin,
- Typ V Neuregulin,
- Typ VI Neuregulin sind Proteine mit 3 N-terminalen Domänen. (Steinthorsdottir V, 2004)

Neuregulin-1 stellt ein EGF-ähnliches, extrazelluläres Signalmolekül dar, das mit transmembranösen Tyrosinkinaserzeptoren der EGF-Rezeptorfamilie, HER-2, HER-3, HER-4 interagiert. Funktionelle Neuregulin Rezeptoren sind *in vivo* HER-2/HER-3 bzw. HER-2/HER-4 Heterodimere.

Das Neuregulin/ErbB Signalsystem steuert embryonal und im adulten Organismus vielfältige biologische Prozesse, wie zum Beispiel, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen und Geweben. (Garratt AN, 2000)

3.5 Homodimere versus Heterodimere

EGFR Homodimere werden enzymatisch abgebaut, während EGFR-HER-2 Heterodimere mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen und danach recycelt werden. (Martinelli E, 2009)

Homodimere sind schwächere Effektoren verglichen mit Heterodimeren. Der häufigste Heterodimerpartner ist HER-2 und EGFR, wobei HER-2 plus EGFR mit Neuregulin die stärkste Kombination ergibt; HER-2 verlangsamt außerdem die Internalisierung und somit den Abbau von HER-1. Für die Dimerisierung von HER-1 wird jedoch ein Ligand benötigt. Hingegen ist für die Dimerisierung und Aktivierung von HER-2 mit einem anderen HER kein Ligand erforderlich ist. Das komplexe Netzwerk, welches dadurch ausgelöst wird umfasst den Ras- und MAPK Signalweg. (Martinelli E, 2009) Eine HER-1/HER-2 Dimerisation führt ebenfalls zur Aktivierung des MAPK Signalweges. (Campiglio M, 1999)

Die Aktivierung von Ras und MAPK aktiviert wiederum nukleäre Proteine, welche für den Zellzyklus von der G1 Phase bis zur S Phase erforderlich sind. Es wurde gezeigt, dass EGFR Signale auch an weiteren Prozessen, welche zur Entstehung von Karzinomen beitragen, beteiligt sind wie zum Beispiel, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Hemmung der Apoptose über den mTOR-Signalweg gehemmt. (Hudis CA, 2007; Olayioye MA e. a., 2001; Salomon DS, 1997)

Alle 4 HER-Rezeptor Typen sind im Brustdrüsenepithel der erwachsenen Frau zu finden, wobei EGFR und Her-2 bevorzugt bei jungen Frauen exprimiert werden. (Yang Y, 1995)

Eine Expression von EGFR wird generell in 30-50% aller Mammakarzinome gefunden. Diese Zahl kann jedoch auch, abhängig von den Beurteilungskriterien zwischen 14 und 91% schwanken. (Klijn JG, 1993; Walker RA, 1999) Bei Mammakarzinomen wird eine EGFR Überexpression beinahe niemals durch eine Genamplifikation hervorgerufen, eher durch erhöhte Rezeptorsynthese. (Earp HS, 1995).

Eine Dimerisation von HER-2 mit HER-3 aktiviert den PI3K Signalweg und spielt in der Karzinogenese eine entscheidende Rolle. (Menard S, 2000)

Beim Mamma- und Ovarialkarzinom stimuliert der Ligand Heregulin, welcher nur an HER-3 und Her-4 bindet, das Tumorwachstum. (Lewis GD L. J., 1996)

Weiters zeigten zwei Studien (Hudelist GD, 2003; Witton CJ, 2003), welche auf Protein Expression basieren, eine stark positive Assoziation zwischen HER-2 und HER-3. Aus diesem Grund wird angenommen, dass HER-2/HER-3 Heterodimere vorzugsweise in Subgruppen von Mammakarzinomen vorkommen. (Kalemi TG, 2007)

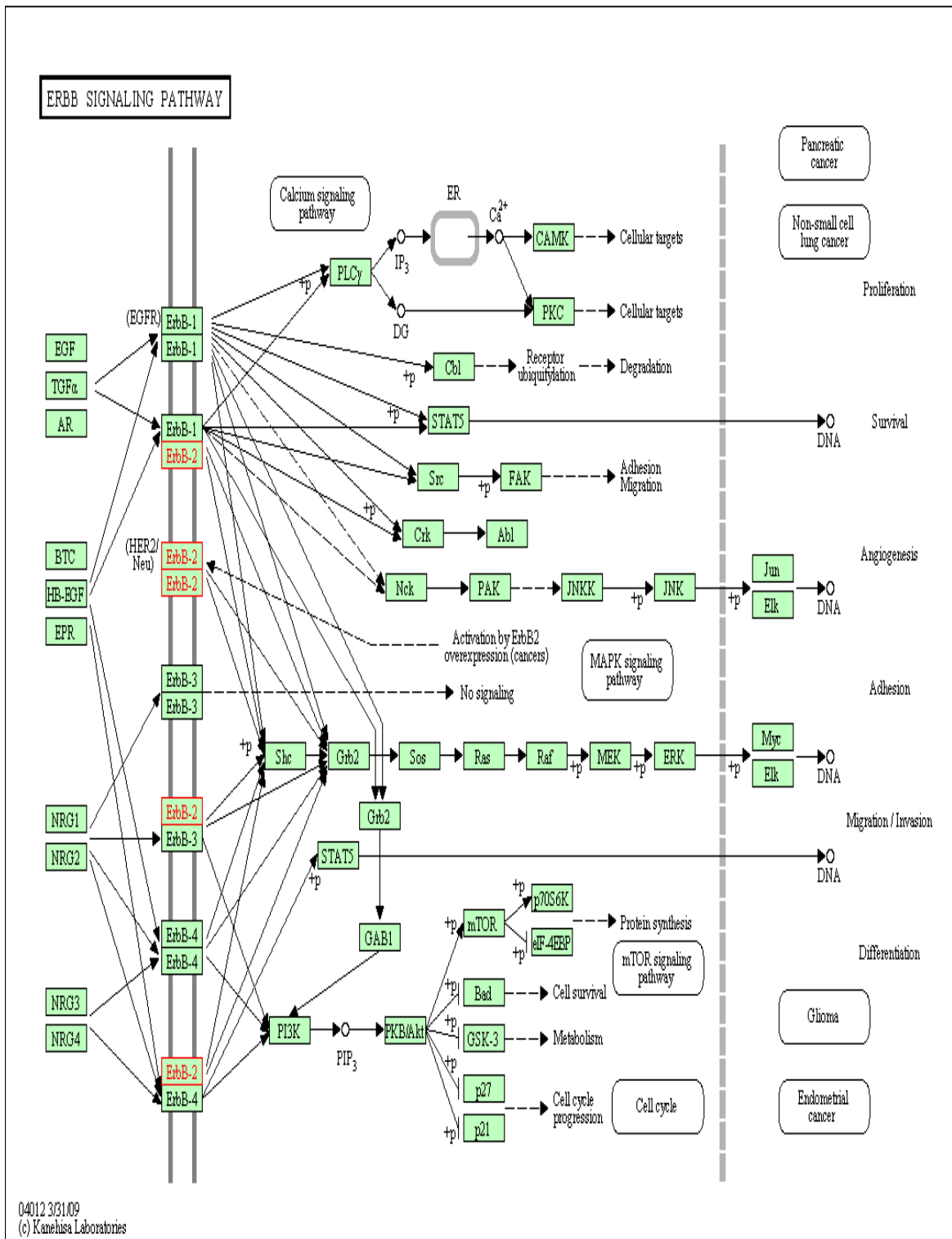
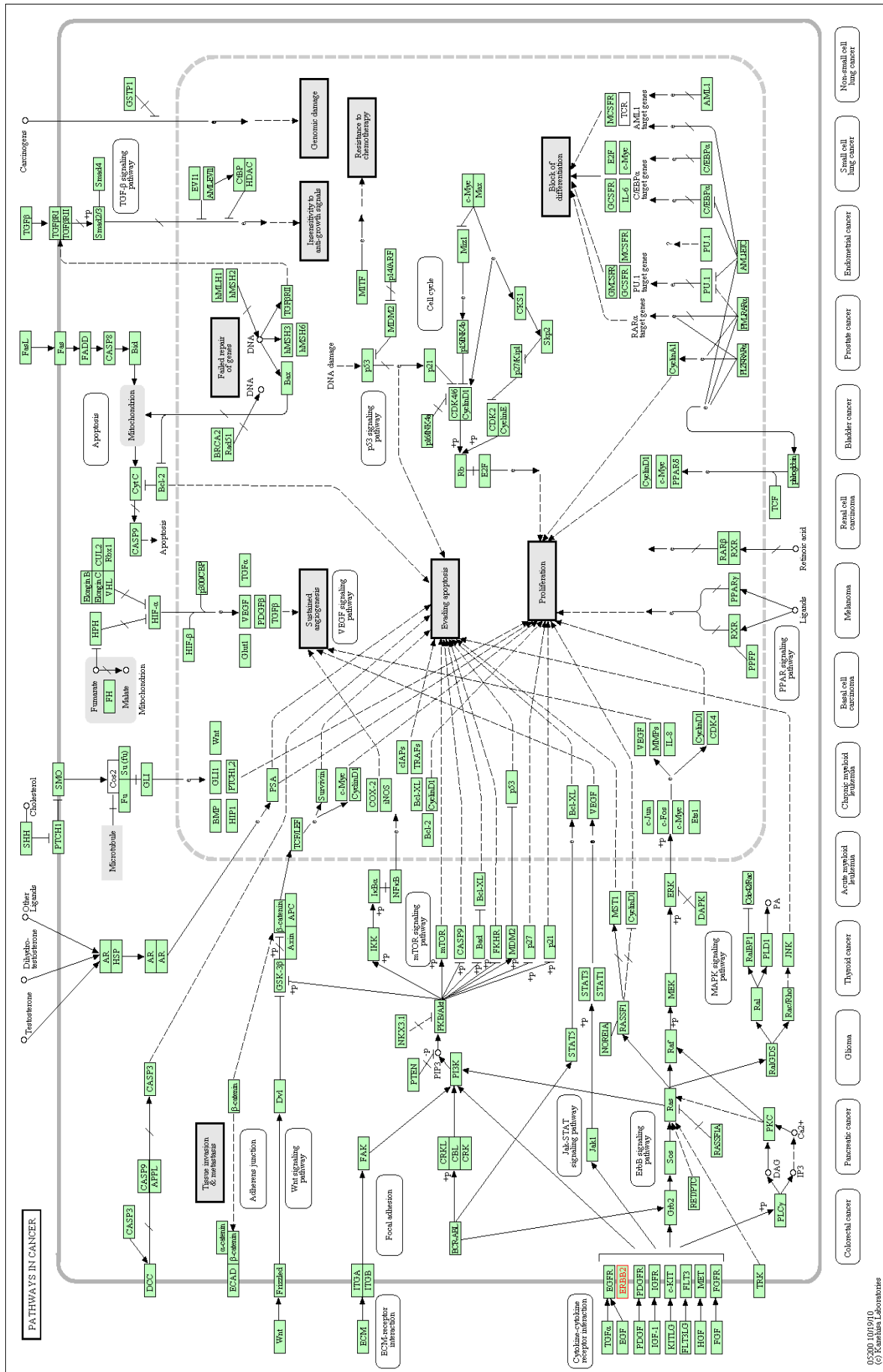


Abbildung 1: ERBB-Signaling Pathway

Abbildung 2: Pathways in Cancer



05200 10/1910
© Karlsruher Laboratorien

4 HER-2 downstream pathways und unmittelbare HER-2 Einflußfaktoren

HER-2 ist eine Tyrosinkinase, welche keinen eigenen Liganden aufweist und ist nicht in der Lage Wachstumsfaktoren zu binden. Durch Bindung an Liganden-gebundenen EGF Rezeptoren kommt es zu Bildung von Heterodimeren. Diese Heterodimere spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung des MAPK und des PI3K pathway. (NCBI Gene)

Wie in Abbildung 1 dargestellt, gibt es verschiedene Hetero- als auch Homodimerformen, wie zum Beispiel ErbB-1/ErbB-1 oder ErbB-2/ErbB-3.

ErbB-2/ErbB-2 Homodimere aktivieren den Ras/Raf/MEK/ERK Kinaseweg. Dies beginnt an der Zellmembran: Durch Phosphorylierung nach ErbB-2/ErbB-2 Homodimerbildung kommt es zur Aktivierung vom transforming protein 1 (SHC). SHC ist ein Substrat für Tyrosinkinasen, welches an das growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) bindet. (Margolis B, 1994) GRB bindet an die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und beinhaltet eine SRC-homology 2 Domäne (SH2-Domäne) und zwei SRC-homology 3 Domänen (SH3-Domäne). (NCBI Gene) Im weiteren Schritt koppelt SHC an GRB2 und aktiviert Son of sevenless homolog (SOS). SOS ist ein GDP/GTP (Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat) Exchanger für rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS)-Proteine. (Margolis B, 1994) GTP-Bindungen aktivieren RAS-Proteine, während die GTP-Hydrolyse die RAS-Proteine inaktiviert. (NCBI Gene) SOS koppelt an RAS und im weiteren Schritt an rat fibrosarcoma (RAF). RAS spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Es kann entweder GTP binden (RasG) oder es kann sein, dass GTP zu GDP hydrolysiert ist. RAF ist eine Serin/Threonin Kinase. (Margolis B, 1994) Einmal aktiviert, ist RAF in der Lage durch Phosphorylierung die Proteinkinasen mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1) und mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAP2K2) zu aktivieren. Diese wiederum aktivieren durch Phosphorylierung die Serin/Threonin-spezifischen Tyrosinkinasen extracellular signal-regulated kinases 1 und 2 (ERK1 und ERK2). Aktivierte ERK`s spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose, der Zelldifferenzierung und der Zellmigration. (NCBI Gene)

Im Nukleus wird myelocytomatosis viral oncogene homolog (Myc) und Elk (eine Mitglied der E-twenty-six Familie) durch Phosphorylierung aktiviert, welche in die DNA eingreifen.

Myc ist ein menschliches Gen, welches für das c-Myc Protein codiert. Es spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus, bei der Apoptose und in der Zelltransformation. Mutationen oder Translokationen von *Myc* können zur Entstehung diverser Tumore, zum Beispiel dem Burkitt-Lymphom, führen. (NCBI Gene)

Elk gehört zur E-twenty-six (Ets) Familie. Ets sind Transkriptionsfaktoren und gehören zur Untergruppe des ternary complex factor (TCF). Proteine der TCF Unterfamilie bilden den ternary complex, durch die Bindung des serum response factors und des serum response elements an den Promotor des c-fos Protoonkogens. (NCBI Gene)

ErbB-2/ErbB3 Heterodimere und ErbB-2/ErbB-4 Heterodimere aktivieren die PI3K. PI3K's werden abhängig von Sequenzhomologie, Substratpräferenz und Verteilung im Gewebe in 3 Klassen eingeteilt. Klasse I wird noch weiter in Klasse IA und Klasse IB unterteilt, wobei IA am häufigsten für die Entstehung von Karzinomen verantwortlich gemacht wird. Die wichtigsten Faktoren der Klasse IA sind p110 α und seine regulatorische Untereinheit, p85. Diese spielen in der Regulation der Zellteilung und in der Tumorentstehung eine zentrale Rolle. p110 α setzt sich aus fünf Komponenten zusammen: aus einer Kinase mit der CTF-Domäne, einer Adapter-bindenden Domäne, einer RAS-bindenden Domäne (RBD), einer C2-bindenden Domäne, welche sich mit der Untereinheit p85 verbindet und einer helikalen Domäne. p85 setzt sich auch aus fünf Domänen zusammen, unter anderem aus der SH2 und der inter-SH2 Domäne. In ihrem Grundzustand ist diese Domäne gebunden und inhibiert p110 α . (Chalhoub N, 2009)

Ein weiterer ErbB Signalweg wird durch ErbB-1 und ErbB-2 Heterodimere aktiviert, wobei EGF, TGF- α , der Androgenrezeptor (AR) und der heparin binding-EGF (hb-EGF) als Liganden fungieren. Dadurch kommt es an der Zellmembran zur Bildung von ErbB-1/ErbB-2 Heterodimeren. ErbB-1 aktiviert im Zytoplasma den signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5). Dies wirkt sich auf die zelluläre DNA aus (zelluläres Überleben). STAT5 ist ein Mitglied der STAT Familie.

Diese gehören zu Transkriptionsfaktoren und werden phosphoryliert, um im Zellkern Homo- oder Heterodimere zu formen, welche im Zellkern die Transkription aktivieren. STAT5 spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, welche durch verschiedene Zellliganden, wie zum Beispiel, IL-2, IL-4, CSF-1 und andere Wachstumshormone ausgelöst wird. (NCBI Gene)

Weiters aktivieren ErbB-1/ErbB-2 Heterodimere im Zytoplasma das v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (SRC), welches durch Phosphorylierung FAK aktiviert. Dieser Komplex führt zu Adhäsion und Migration. SRC ist ein Protoonkogen und könnte eine Rolle in der embryonalen Entwicklung und im Zellwachstum spielen. Das Protein ist eine Tyrosinkinase und kann durch die Phosphorylierung der c-SRC Kinase gehemmt werden. (NCBI Gene) Eine Aktivierung von *FAK*, auch bekannt als protein tyrosin kinase 2 oder PTK2, könnte eine wichtige Rolle am Anfang des Zellwachstums und im intrazellulären Signaltransduktionsweg spielen. (NCBI Gene)

Ein weiterer Pathway der ErbB-1/ErbB-2 Heterodimere ist die Aktivierung von v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (CRK) durch Phosphorylierung und im weiteren Schritt die Aktivierung von c-abl oncogene 1 (ABL) im Zytoplasma. CRK ist ein Mitglied der Adapter Protein Familie, welches an mehrere tyrosin-phosphorylierte Proteine bindet. Adapter Proteine haben lediglich eine vermittelnde Funktion und weisen selbst keine Enzymaktivität auf. Das Protein hat mehrere SH2 und SH3- Domäne und ist an verschiedenen Signalpathways beteiligt. Das *Abi*-Onkogen codiert eine zytoplasmatische und eine nukleare Tyrosinkinase, welche bei Prozessen wie der Zelldifferenzierung, der Zellteilung, der Zelladhäsion und bei Stressreaktionen der Zelle eine Rolle spielen. (NCBI Gene)

Durch eine HER-2 Überexpression kommt es zu einer erheblichen Störung von Proteinen, welche den Zellzyklus regulieren. PI3K-Akt und MAPK sind wichtige Proteine des Signalweges. (Neve RM, 2002) MAPK induziert die Expression des Protoonkogens *c-Myc*. Dieser Transkriptionsfaktor unterdrückt den Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitor p21 (auch als p21WAF1 oder WAF1 bezeichnet), welcher normalerweise die Zellproliferation inhibiert. p21 blockiert normalerweise die Zellproliferation indem es den Zellzyklus Arrest induziert. (Spector NL, 2009) Der Zellzyklus wird über die sogenannte cyclin-depentend kinase (CDK) reguliert.

Diese interagieren mit den Cyclinen um die biochemischen Abläufe zu koordinieren. Eine kleine Gruppe sogenannter CDK-Inhibitoren binden und inhibieren normalerweise die Aktivität von Cyclin/CDK Komplexen. Sie binden und inhibieren so eine breite Palette von CDK-Komplexen, bevorzugen jedoch Komplexe mit CDK2. Der CDK-Inhibitor p21 spielt eine wesentliche Rolle im Wachstumsarrest nach DNA-Schädigung. Eine Überexpression von p21 führt zu G1, G2 oder S-Phase Arrest. Dies stellt ein Downstream Signal des PI3K-Akt/PKB Pathways und von p53 dar. Höhere Konzentrationen des p21 könnten auch einen weniger indolenten Typ des Mammakarzinoms hervorrufen. Jedoch ist die Rolle von p21 bei Mammakarzinomen umstritten. Es wurde gezeigt, dass HER-2 überexprimierende Brustkrebszellen, durch erhöhte Expression von p21, Chemoresistenz induzieren können und dass eine Expression von p21 mit einer schlechteren Prognose verbunden ist. (Kalemi TG, 2007)

Ein weiteres Mitglied der CDK Familie ist p27^{Kip1}. p27^{Kip1} ist der prävalenteste Wachstumsinhibitor bzw. Tumorsupressor, da er in der Lage ist die Aktivität von Cyclin A-CDK2, Cyclin B-CDK2, Cyclin D-CDK4 und Cyclin E-CDK2 zu hemmen. Proliferierende Zellen können durch erhöhtes p27^{Kip1} dem Zellzyklus entkommen, während erniedrigtes p27^{Kip1} zur Fortsetzung der Proliferation führt. Im Gegensatz dazu, ist keine oder nur eine geringe Expression von p27^{Kip1} mit exzessiver Zellproliferation verbunden. (Kalemi TG, 2007)

Yakes et al. berichten, dass in HER-2 amplifizierten Brustkrebszelllinien Trastuzumab die HER-2 Aktivierung/Phosphorylierung hemmt, was sich auf nachfolgenden Moleküle (PI3K-Akt und p21) im Zellzyklus auswirkt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass der Kinaseregulator Cyclin D nach 72 Stunden reduziert wird. Nach 6 Tagen hat sich die Zellproliferation um mehr als 50% reduziert. (Yakes FM, 2002) In einer Studie von Asanuma et al. wurden 53 Gewebeproben von Mammakarzinompatientinnen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Trastuzumab sowohl den PI3K-Akt als auch den MAPK-Erk Signalweg hemmt. (Asanuma H, 2005)

PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol 4,5 Biphosphat (PIP2). Dadurch entsteht der second messenger Phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphat (PIP3). Diese Signaltransduktion ist an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert und aktiviert Akt (auch Proteinkinase B genannt), wodurch im Gegenzug Phosphatase and tensin homolog (PTEN) aktiviert wird.

Nach der Aktivierung von Akt fördern verschiedene Gene die Zellproliferation und blockieren die Apoptose. (Vivanco I, 2002; Karakas B, 2006) Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose, welches die Karzinomentstehung begünstigt. Neben *PTEN* gibt es noch mehrere verschiedene Tumorsuppressorgene, wie zum Beispiel *TSC1*, *TSC2*, *STK11*, *Foxo1a*, *Foxo3a* und möglicherweise *PHLPP*. (Stephens L, 2003)

PTEN ist ein Tumorsuppressorgen, das auf Chromosom 10q23 lokalisiert ist. *PTEN* Mutationen werden in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen (Fujita T, 2006) wie z.B. Endometriumkarzinomen (Risinger JI, 1997; Tashiro H, 1997), high-grade Gliomen (Louis DN, 1995) und Prostatakarzinomen (Cairns P, 1997), beobachtet. Das Protein, welches für *PTEN* kodiert ist eine Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat 3-Phosphatase (siehe Abbildung 2). Es enthält eine tensin-ähnliche Domäne sowie eine katalytische Domäne. Anders als die meisten Protein-Tyrosin-Phosphatasen, führt *PTEN* eher zur Dephosphorylierung von Phosphoinositol Substraten. (NCBI Gene) Weiters antagonisiert *PTEN* auch die PI3K Funktion und beeinflusst auch die Funktion von AKT im negativen Sinn. Eine *PTEN* Expression in *PTEN*-null-Zellen inhibiert die AKT Aktivität und somit die Tumorbildung. (Li DM, 1998) PI3K und AKT spielen eine wesentliche Rolle bei der Proliferation von Zellen und induzieren die Expression vieler Zytokine. (Downward J, 1998) Laut Nagata et al., trägt der *PTEN*-Status auch zur Wirksamkeit von Trastuzumab bei. (Nagata Y, 2004) Es wurde auch die selektive Hemmung anderer Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren untersucht, z.B. Ras/Raf/MAPK pathway, JNK-mediated pathways und bcl2 Apoptose Protein, in Trastuzumab sensitiven und –resistenten SKBR3 –Zellen. Dabei wurden kleinere Effekte beobachtet. (Fujita T, 2006; Meuillet EJ, 2004) In den letzten Jahren wurden auch selektive Akt und mTor Inhibitoren, vor allem in vorklinischen Studien und Phase I Studien erprobt. (Fujita T, 2006)

In der Studie von Lerma et al. wurden 56 aggressiv verlaufende Mammakarzinome, welche einen negativen Östrogen- und Progesteronstatus aufwiesen, untersucht. 52% waren HER-2 negativ und 48% waren HER-2 positiv, 9% (5 der Patientinnen) wurden mit Trastuzumab behandelt. 12,5% (7 Patientinnen) der 56 aggressiven Mammakarzinome zeigten eine PIK3CA Mutation. PIK3CA Mutationen bei HER-2 positiven Tumoren sind mit schlechter Prognose assoziiert.

Unter den 27 der HER-2 positiven Karzinome wurden sechs PIK3CA Mutationen gefunden. Alle kamen in der Kinase Domäne (Exon 20) und nicht in der helikalen Domäne (Exon 9) vor. Diese Mutationen waren bei HER-2 positiven Karzinomen häufiger als bei triple negativen Mammakarzinomen, letztere sind sehr selten mutiert (1 von 29). Des Weiteren zeigte sich, dass die PIK3CA Mutationen mit einer p110 α Überexpression verbunden ist. (Lerma E, 2008) p110 α gehört zu den Klasse I PIK3's. Die Klasse I besteht aus 3 Mitgliedern: p110 α , p110 β und p110 δ . Diese werden durch Rezeptortyrosinkinasen aktiviert und sind eine Untergruppe der PI3K's. (Stein RC, 2001)

Die c-DNA Mikrochip Analyse ermöglichte es, 5 genetische Untergruppen von Mammakarzinomen (luminal A, luminal B, HER-2 positiv, normal like, basal Type) zu identifizieren: die häufigste Form ist der lumbale Typ. Dieser ist äquivalent mit den Hormon-abhängigen Tumoren. Daneben gibt es noch 2 aggressivere Formen, nämlich die HER-2-überexprimierenden Tumore und triple negative Tumore vom Basalzell Typ. (Perou CM, 2000; Sorlie T, 2003)

Laut verschiedener Studien (Bachman KE, 2004; Buttitta F, 2006; Campbell IG, 2004; Levine DA, 2005; Perez-Tenorio G, 2007) gibt es in 20% - 40% der Mammakarzinome eine PIK3CA Mutation. Schätzungsweise finden sich 85% dieser Mutationen an folgenden 3 Punkten: H1047R, lokalisiert in der Kinase Domäne, die von Exon 20 kodiert wird; E542K und E545K, welche in der helikalen Domäne lokalisiert sind und von Exon 9 kodiert werden. In beiden Exons findet man gleich häufig Mutationen (~12%). (Barbareschi M, 2007; Buttitta F, 2006; Karakas B, 2006) Dies könnte man mit Hilfe der denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) nachweisen.

In der Studie von Lerma et al. gab es nur in etwa 12% der Fälle PIK3CA Mutationen. (Lerma E, 2008) Exon 20 Mutationen wurden in 22,2% der HER-2 überexprimierenden Mammakarzinome festgestellt. Dies stimmte mit der Studie von Saal et al. überein. (Saal LH, 2005) Man nimmt an, dass Exon 20 Mutationen mit höherer Aggressivität (Bader AG, 2005) und schlechterer Überlebensprognose assoziiert sind. PIK3CA Mutationen sind bei triple negativen Mammakarzinomen selten. (Lerma E, 2008)

Eine Überproduktion von p110 α wurde in der Studie von Lerma et al. mit PIK3CA Mutationen in Verbindung gebracht.

Ein Zusammenhang zwischen PIK3CA Mutationen oder p110 α Überexpression und dem Verlust von *PTEN* oder der Aktivität von AKT, konnte, im Gegensatz zu anderen Studien (Buttitta F, 2006; Li SY, 2006; Perez-Tenorio G, 2007; Saal LH, 2005), in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. In einer Studie von Pèrez-Tenorio wurde festgestellt, dass sich PIK3CA Mutationen und der Verlust von *PTEN* nicht gegenseitig ausschließen (Perez-Tenorio G, 2007), wie anfänglich von Saal et al. angenommen (Saal LH, 2005).

Eine Aktivierung der Signalwege von PIK3/PTEN/Akt könnte eine wichtige Rolle in der Therapieresistenz der Mammakarzinome spielen. (Kirkegaard T, 2005) PIK3CA Mutationen könnten auch mit Radiosensitivität (Perez-Tenorio G, 2007) und Chemosensitivität (Liang K, 2006) in Zusammenhang stehen. Eine Vielzahl von Molekülen, welche PIK3 (Stephens L, 2003) oder AKT (Whyte DB, 2006) hemmen, könnten neue potentielle Möglichkeiten in der Therapie des Mammakarzinoms darstellen.

5 Wirkmechanismen von anti-HER-2 Therapeutika

5.1 Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin[®]) wurde von der Food and Drug Administration in den USA 1998 das erste Mal zugelassen, um Patientinnen mit HER-2 positiven Mammakarzinomen zu behandeln. (Slamon DJ, 2001)

Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der an die Domäne IV (Cho HS, 2003) des extrazellulären Segments vom HER-2/neu Rezeptor bindet. Während der G1-Phase unterliegen die Zellen einem Zellzyklusarrest. Dies hat eine verminderte Proliferation der Zellen zur Folge. Trastuzumab führt zur Downregulation von HER-2/neu, was zur Spaltung der Rezeptordimerisierung führt. Weiters kommt es zur Hemmung des nachfolgenden PI3K-Pathways. Es kommt zu keiner Phosphorylierung von p27^{Kip}. p27^{Kip} kann in den Zellkern eindringen und dort die Aktivität von von CDK2 hemmen, was zu einem Zellzyklusarrest führt. (Kute T, 2004)

Bei der Überexpression von HER-2, zeigte die Studie von Molina et al., dass Trastuzumab den Abbau der extrazellulären Domäne von HER-2 durch die Hemmung der Metalloproteinkinaseaktivität blockieren kann. Allerdings fanden die Forscher einen phosphorylierten, jedoch inkompletten Rezeptor in 14 von 21 Mammakarzinomproben. Mehrere Studien (Fornier MN, 2005; Kostler WJ, 2004) zeigten, dass eine Abnahme der extrazellulären Domäne des Serum-HER 2 während der Behandlung mit Trastuzumab mit dem Ansprechen des Tumors einhergeht. Dies verstärkt die Annahme, dass Trastuzumab durch die Hemmung der HER-2-Spaltung tätig werden kann. (Molina MA, 2001)

Ob Trastuzumab eine verminderte Expression und einen Abbau von HER 2 bei Brustkrebs induziert, wird diskutiert. (Sarup JC, 1991; Valabrega G, 2005) Auch werden die Mechanismen der PI3K genauer diskutiert. Die aktivierte PI3K generiert Phosphoinositol durch die Translokation von AKT zur Plasmamembran.

Die aktivierte AKT wird durch die antagonisierende Wirkung der Phosphatase und *PTEN* negativ beeinflusst. Von Trastuzumab wird angenommen, dass es die Signalisierung dieser Reaktionen reduziert und dadurch die Apoptose fördert und die Proliferation hemmt. (Delord JP, 2005)

Eine HER2 Überexpression ist eng verbunden mit erhöhter Angiogenese. (Yen L, 2000) Ein weiterer Effekt von Trastuzumab ist die Hemmung der Angiogenese. (Albanell J, 2003) Bei Mäusen, kam es in einem HER-2 überexprimierenden Brustkrebsmodell unter Trastuzumab, zu einer Normalisierung und Regression der Tumorblutgefäße. (Valabrega G, 2007)

Izumi et al. beobachteten eine Verringerung der Produktion des endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) von Tumorzellen (in vitro). Dies könnte auf einen unabhängigen antiangiogenen Mechanismus von VEGF in vivo hinweisen. (Izumi Y, 2002)

Klinische Studien haben gezeigt, dass Trastuzumab nicht nur zytostatisch wirkt sondern auch einen indirekten zytotoxischen Effekt hat. Dieser Prozess wird als antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) bezeichnet. (Cooley S, 1999) ADCC aktiviert die natürlichen Killerzellen, der Fc-Gamma Rezeptor der natürlichen Killerzelle (NK-Zelle) bindet an die Fc Domäne von Trastuzumab. Dies führt zur Zerstörung der an Trastuzumab gebundenen Tumorzellen. (Clynes RA, 2000)

Laut einer Studie von Gennari et al. wurden 11 Patienten mit Brustkrebs 4 Wochen lang mit Trastuzumab präoperativ behandelt. Biopsien und Blutkontrollen wurden durchgeführt, alle zeigten eine beträchtliche Infiltration von Lymphozyten im Tumorgewebe. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese einer ADCC Aktivität von Trastuzumab. (Gennari R, 2004)

5.2 T-DM1

Bei einem neueren Ansatz wird Trastuzumab an ein Chemotherapeutikum gekoppelt. Da die HER-2 Expression bei Tumoren (1-2 Millionen Proteine pro Zelle), im Vergleich zu normalen epithelialen Zellen, deutlich vermehrt ist, stellt HER-2 einen idealen Angriffspunkt für ein antibody-drug conjugate (ADC) dar. ADC bedeutet ein Ankoppeln eines zytotoxischen Stoffes an einen therapeutischen Antikörper. (Burststein HJ, 2007; Pegram M, 1991)

Eine direkte kovalente Bindung zytotoxischer Wirkstoffe an monoklonale Antikörper stellt eine Alternative zu der bisherigen Antikörper basierenden zielgerichteten Therapie dar. In bisherigen Versuchen wurden an die HER-2 Antikörper folgende zytotoxische Wirkstoffe gekoppelt: Calicheamicins, Auristatins oder Maytansine. (Lambert JM, 2005; Polakis P, 2005) Maytansinoide sind zytotoxische Derivate des Stoffes Maytansine. Maytansinoide - Antikörper Konjugate richten sich direkt gegen das Tumorantigen. (Lambert JM, 2005) Es wurde gezeigt, dass sich Trastuzumab sehr gut mit Mikrotubulus-gerichteten Substanzen verbindet. (Burstein HJ, 2007; Pegram M, 1991) Aufgrund des Wirkmechanismus von Maytansine, dürfte dies ein besonders guter zytotoxischer Wirkstoff sein um ihn mit Trastuzumab zu konjugieren. (Lewis Phillips GD, 2008)

T-DM1 zählt zu den antibody-cytotoxic drug conjugate und besteht aus 3 Hauptkomponenten: Aus dem Antikörper, dem Linker und dem cytotoxischem Stoff. Die Wirksamkeit einer solchen Verbindung wird durch die unterschiedliche Expression des Ziel-Antigens am Tumor bestimmt. Um maximal wirken zu können, benötigt sowohl Trastuzumab als auch Lapatinib einen „funktionierenden“ HER-2 Rezeptor mit entsprechendem downstream Pathway. Studien von Nahta und Ritter (Nahta R, 2005; Ritter CA, 2007) zeigen, dass die HER-2 Expression an den Tumorzellen nicht vermindert wird, wenn diese gegen eine „funktionelle“ HER-2 Therapie resistent werden. Aus diesem Grund, könnte ein Trastuzumab Konjugat, welches HER-2 nur als Andockstelle für einen potenten zytotoxischen Stoff verwendet, als mögliche Therapieoption in Betracht gezogen werden. In der Studie von Lewis Phillips et al. wurde festgestellt, dass eine anti-Trastuzumab ADC eine beträchtliche Wirkung, sowohl in vivo als auch in vitro, bei Trastuzumab-refraktären Zellkulturen besitzt (im Bezug auf HER-2 amplifizierte Mammakarzinome). Jedoch variiert die Verträglichkeit dieser Konjugate beträchtlich und ist an sich abhängig von der chemischen Struktur des Linkers und des zytotoxischen Stoffes. Das Maytansinoid, DM1 (Drug Maytansinoid), wird an Trastuzumab durch SSP, SMCC oder SDSP (Linker) gebunden. Trastuzumab-MCC-DM1 besitzt eine günstige Pharmakokinetik im Vergleich zu anderen Trastuzumab Konjugaten, welche durch Disulfidbrücken an Trastuzumab gebunden sind. Diese Ergebnisse bilden einen neuen wichtigen Aspekt in der Behandlung von HER-2 positiven Tumoren.

Weitere klinische Studien sind im Laufen, um die Sicherheit und Wirksamkeit von Trastuzumab-MCC-DM1 beurteilen zu können. (Lewis Phillips GD, 2008)

5.3 Pertuzumab

Pertuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen einen Abschnitt der extrazellulären Domäne von HER-2 richtet und die Heterodimerisation von HER-2 blockiert. HER-2 ist dadurch nicht mehr fähig mit anderen Mitgliedern der HER-Familie zu dimerisieren. (Agus DB, 2002) Es verhindert also die Dimerisation von HER-2 mit anderen HER-Rezeptoren (HER-3, HER-1 und HER-4). (Adams CW, 2006; Diermeier S, 2005; Franklin MC, 2004)

Pertuzumab ist der erste einer neuen Gruppe von Wirkstoffen, die unter dem Namen HER-Dimerisierungs-Inhibitoren bekannt sind. Studien von Cho et al. (Cho HS, 2003) zeigten, dass die Bindung der extrazellulären Domäne von HER-2 an Trastuzumab sich von der Bindung an Pertuzumab unterscheidet.

An einer HER-2 überexprimierenden Brustkrebszelllinie (BT474), stellte man fest, dass eine Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab die Apoptose und den Zellwachstumsarrest erhöhten (verglichen mit einer Trastuzumab Monotherapie). (Nahta R, 2005)

Da Pertuzumab an ein anderes HER-2 Epitop als Trastuzumab bindet, könnten sich diese Substanzen in ihrem Wirkmechanismus ergänzen, wodurch auch der Therapieerfolg verbessert wird. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von HER-2 positiven Brustkrebspatientinnen aufweisen. Die auftretenden Nebenwirkungen betreffen hauptsächlich den GI-Trakt und die Haut. Diese waren jedoch mild bis mäßig und wurden wahrscheinlich durch die reduzierte Anzahl von HER-1:HER-2 Heterodimeren ausgelöst. (Baselga J, 2010)

Eine Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab bei HER-2 positiven Mammakarzinom förderte die Apoptose und blockierte das Zellwachstum in höherem Ausmaß als Trastuzumab alleine. (Valabrega G M. F., 2007)

Studien zeigten auch, dass die Wirkung von Pertuzumab bei HER-2 positiven Mammakarzinomen stärker ist als bei HER-2 negativen.

In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Monotherapie mit Pertuzumab, bei HER-2 negativem Mammakarzinom, ebenfalls einen Effekt zeigte: (10% der Patienten zeigten ein partielles Ansprechen oder kein Fortschreiten des Karzinoms in ≥ 6 Monaten). (Baselga J, 2010)

Eine second-line Therapie mit Trastuzumab und Capecitabine zeigte eine Ansprechrate von 48% und eine mediane time to progression (TTP) von 8,2 Monaten (Baselga J, 2010), während Lapatinib plus Capecitabine, in einer ähnlichen Patientinnengruppe, eine Ansprechrate von 24% und eine mediane TTP von 6,2 Monaten zeigte. (Cameron D, 2008) Weiterführende Studien im Bezug auf die Wirksamkeit von Pertuzumab bei HER-2 positivem Mammakarzinom sind geplant bzw. gerade in Gang. (Baselga J, 2010)

5.4 Lapatinib

Lapatinib ist ein dualer Tyrosinkinaseinhibitor, welcher sowohl den EGF-Rezeptor als auch HER-2 blockiert. (Spector NL, 2005) Lapatinib ist in der Lage die intrazelluläre Domäne von HER-2 sowie auch von HER-1 reversibel zu hemmen. Es bindet an die ATP-Bindungsstelle der EGFR/HER-2 Protein Kinase Domäne und verhindert dadurch die Aktivierung des Rezeptor-Tyrosinkase pathways. (Bilancia D, 2007) Es hemmt sowohl den „Wildtyp“ des HER-2 Rezeptors als auch dessen abgebrochene Form (p95HER-2), sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dadurch lässt sich auch das mögliche Ansprechen von Lapatinib in Trastuzumab-resistenten Karzinomen erklären. (Scaltriti M C. S., 2010)

5.5 Cetuximab

Cetuximab ist ein chimärer Antikörper vom Typ IgG1 Immunglobulin. Es bindet mit einer zweifach höheren Affinität an EGFR als natürliche Liganden, wie beispielsweise TGF- α oder EGF. (Kim ES, 2001) Eine Bindung von Cetuximab an den EGFR stoppt den Zellzyklus in der G0/G1 Phase, CDKN 1B wird zur Regulation des Zellzyklus vermehrt exprimiert.

Weiters kommt es zur Apoptose durch die vermehrte Expression proapoptischer Proteine, wie Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9) (Mayo LD, 2001) oder durch die Inaktivierung anti-apoptischer Moleküle wie B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2). (Gingras AC, 1998) Cetuximab inhibiert auch die Bildung pro-angiogenetischer Faktoren, wie Interleukin-8, den VEGF und den basic fibroblast growth factor. Die Inhibition dieser Faktoren reduziert die Angiogenese und die Entstehung von Fernmetastasen. (Perrotte P, 1999)

EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren sind in der Lage verschiedene Wachstumsfaktor-Rezeptoren der EGFR Familie oder auch den VEGF-Rezeptor zu blockieren. Anti-EGFR monoklonale Antikörper binden im inaktiven Zustand an die extrazelluläre EGFR-Domäne. Die Antikörper konkurrieren um die Bindungsstelle des Rezeptors wobei sie die Bindungsstelle des Liganden verdecken. Dadurch kommt es zur Blockierung der EGFR-Tyrosinkinase Aktivität. (Martinelli E, 2009)

5.6 Pantimumab

Pantimumab ist ein reiner humaner monoklonaler Antikörper vom Typ IgG2, welcher sich gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors richtet. (Martinelli E, 2009) Pantimumab eignet sich sowohl als Monotherapie wie auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen für die Behandlung verschiedener Karzinome, beispielsweise dem kolorektalem Karzinom oder dem Nierenzellkarzinom. (Rowinsky EK, 2004)

5.7. Weitere therapeutische Ansatzpunkte

Andere Strategien bei Trastuzumab Resistenz inkludieren bi-spezifische Antikörper (welche an HER-2 und an den Fc-Rezeptor binden), die Kombination von Antikörpern, durch Blockade des VEGF oder des VEGF-Rezeptors. (Bartsch R, 2007)

Die Kombination von Trastuzumab mit anderen Downstream-Inhibitoren wird gerade untersucht. Dabei scheinen 2 Inhibitoren von Interesse zu sein: CCI-779 (Wyeth-Ayerst; Madison, NJ) und RAD 001(Novartis, NY). (Chan S, 2005)

Weitere interessante Resultate könnten sich auch durch die Kombination von Trastuzumab und Bevacizumab (ein anti- VEGF monoklonaler Ak) ergeben. (Valabrega G M. F., 2007)

Auch das heat shock-Protein 90, welches die Faltung von HER-2 kontrolliert, ist ein möglicher Ansatzpunkt für Therapien. Multi-targeted Kinaseinhibitoren wie Sunitinib oder Sorafenib sind bereits in der Therapie des Nierenzellkarzinoms etabliert. Diese wurden kürzlich auch bei der Therapie des Mammakarzinoms in einer Phase I/II/III erprobt und dürften interessante Möglichkeiten bei HER-2 positiven und negativen Karzinomen bringen. (Bartsch R, 2007)

Weitere präklinische Studien stellten eine Synergie zwischen Trastuzumab und Gefitinib (ein EGFR Tyrosinkinasehemmer) fest. Dieses Zusammenwirken führte zu einer kompletten Remission von HER2-überexprimierten Brustkrebs. (Normanno N, 2002)

6 Ursachen für Resistenz von Trastuzumab

6.1 PTEN Verlust

Studien von Nagata und Di Cristofano haben gezeigt, dass eine Trastuzumab Resistenz von der Expression von PTEN abhängig sein kann. (Nagata Y, 2004; Di Cristofano A, 1998) Es wurde gezeigt, dass ein *PTEN* Mangel (durch Mutation bedingt) im Zusammenhang mit einer Trastuzumab Resistenz steht. Dies kann bei Mammakarzinomen durch einen Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity) oder einer Mutation des *PTEN* Gens verursacht sein. Eine verminderte *PTEN* Expression ist daher mit invasivem Mammakarzinom und einer schlechten Prognose verbunden. (Garcia JM, 1999; Singh B, 1998) In der Studie von Nagata et al. wurde festgestellt, dass bei Trastuzumab-sensitiven Zellen eine Unterbrechung in der Bindung von SRC an HER-2 fest, sodass AKT gehemmt wird und einen Wachstumsarrest induziert, dies sei durch eine erhöhte PTEN Aktivität an der Zellmembran verursacht. Ist der PTEN Level niedrig, so bleibt AKT aktiv und die Wirkung von Trastuzumab ist beeinträchtigt. Patienten mit einer PTEN-Verminderung haben laut Analysen einen geringeren Benefit, wenn sie mit Trastuzumab behandelt werden im Vergleich zu Patienten mit PTEN Aktivität. Jedoch erhielten diese Patienten eine Kombination von Trastuzumab und einem herkömmlichen zytostatischen Wirkstoff, wodurch keine mögliche Schlussfolgerung über den PTEN Verlust gezogen werden konnte. (Nagata Y, 2004)

6.2 Aktivierung alternativer Möglichkeiten

Der IGF-1R ist ein transmembranöser Tyrosinkinaserzeptor, welcher häufig bei Brustkrebs nachgewiesen wird. (Valabrega G, 2007) Lu et al. entwickelten die human breast cell line SKBR3, die IGF-1R überexprimiert um die Wirksamkeit von Trastuzumab zu beurteilen. IGF-1R-positive SKBR3-Zellen sind unempfindlich gegen die Hemmung, welche durch Trastuzumab induziert wird. (Lu Y, 2001)

Interessant dabei ist, dass sich diese Ergebnisse auch bei einem anderen Zelllinien Modell bestätigen, bei dem eine HER-2 Überexpression exogen induziert wird. Aus diesem Grund kann auch der IGF-1R als möglicher Grund für eine Trastuzumab-Resistenz in Betracht gezogen werden. (Valabrega G, 2007)

6.3 Expression von Liganden der EGF/EGFR Familie

Von den 4 Mitgliedern der EGFR Familie ist HER-2 der einzige ohne bekannten Liganden. Bei einer Überexpression von Liganden kommt es durch Rezeptor-Heterodimerisation zu Proliferation und Hemmung der Apoptose. (Yarden Y, 2001) Möglicherweise spielt TGF- α eine wichtige Rolle bezüglich der Resistenz von Trastuzumab. Von 3 Patientinnen, welche an Brustkrebs mit einer HER-2 Überexpression erkrankt sind und auf eine Behandlung mit Trastuzumab angesprochen haben, erhielt man Tumormaterial vor der Behandlung und von Rezidiven während der Therapie. Bei den Patientinnen bei denen kein TGF- α vor der Therapie nachgewiesen wurde, wurden letztendlich Rezidive festgestellt. Anscheinend kommt es in TGF- α positiven Zellen unter Trastuzumab zu keiner funktionell ausreichenden Verminderung der HER-2 Expression. Eine Resistenz von Trastuzumab könnte daher auch mit einem TGF- α gekoppelten Mechanismus in Verbindung stehen. (Valabrega G, 2007)

6.4 Rezeptor Maskierung oder Epitop Unzugänglichkeit

Nagy et al. untersuchten die Eigenschaften von HER-2 in einer Trastuzumab-resistenten Zelllinie, JIMT1. Dabei stellten sie fest, dass die MUC-4 Expression, ein Membran-assoziiertes Mucin, zur Maskierung von Membranproteinen beiträgt und höher im resistenten Klon (JIMT1) war als in Trastuzumab-sensitiven Zelllinien. Eine experimentell herabgesetzte MUC-4 Expression durch RNA Interferenz wiederum, erhöht die Bindung von Trastuzumab. (Nagy P, 2005)

7 Mögliche Strategien zur Überwindung der Resistenz

Laut einer Studie von Valabrega et al. kommt es in etwa 30% der Brustkrebsfälle zu einer Ko-Expression von HER-2 und EGRF. Aus diesem Grund wäre eine Blockade beider Rezeptoren eine mögliche Strategie um das Ansprechen von Trastuzumab zu verbessern. Diese Kombination wäre auch bei Trastuzumab-resistenten Karzinomen von Bedeutung. (Valabrega G, 2007)

Dieser Frage wurde in der klinischen Neo-ALTTO Studie (**Neo-Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimisation Trail**) nachgegangen. Es handelt sich dabei um eine offene, randomisierte, multizentrische Phase-III-Studie zur neoadjuvanten Therapie mittels Lapatinib, Trastuzumab sowie der Kombination beider Wirkstoffe plus Paclitaxel bei Patientinnen mit primären, HER-2 positivem Mammakarzinom (siehe Abbildung 3)

Die Patientinnen wurden in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt.

Nach der Operation erhielten alle Patientinnen 3 adjuvante Zyklen mit 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC). (German Breast Group, Breast International Group, Experimentales en Tumores Solidos, 2007)

An dieser Studie nahmen 455 Patientinnen mit HER-2 positiven und/oder amplifizierten Mammakarzinom teil. (www.abstract2view.com, 2010, www.clinicaltrials.gov, 2011) Es stellte sich heraus, dass eine duale HER-2/neu Hemmung (Trastuzumab plus Lapatinib) eine signifikant höhere pathologische Komplettremissions-Rate (pCR) zeigte, als eine Monotherapie (entweder Trastuzumab oder Lapatinib). Im Kombinationsarm betrug die pCR 51,3%, im Trastuzumab-Arm 29,5% und im Lapatinib-Arm 24,7%. Bezüglich der Nebenwirkungen, waren diese im Lapatinib-Arm (34%) und im Kombinationsarm (39%) höher als bei einer Trastuzumab Monotherapie. (www.abstract2view.com, 2010)

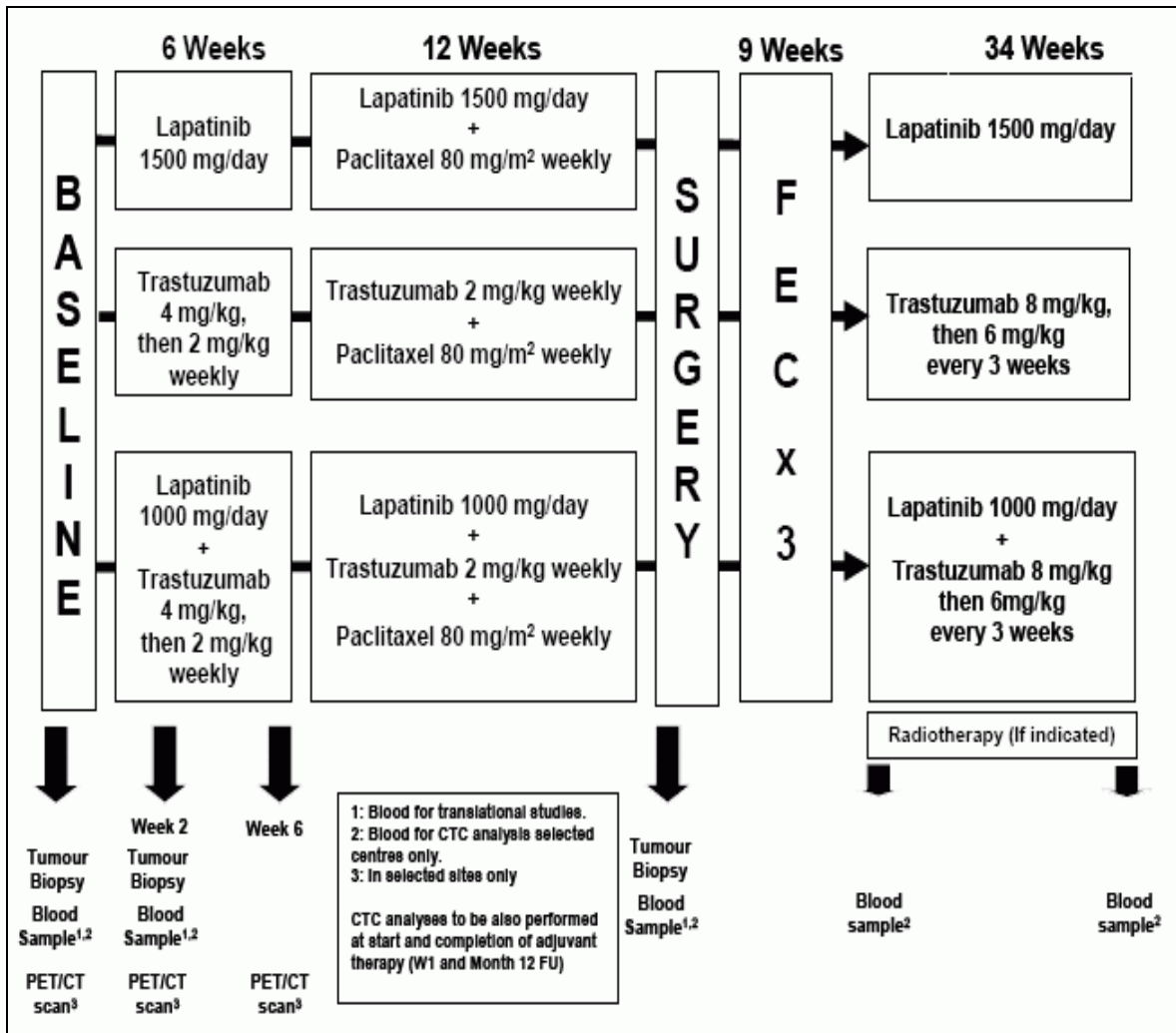


Abbildung 3: Neo-ALTTO Therapieschema

Auch das heat shock- Protein 90, welches die Faltung von HER-2 kontrolliert, ist eine möglicher Ansatzpunkt für Therapien. Multi-targeted Kinaseinhibitoren wie Sunitinib oder Sorafenib sind in Erprobung. (Bartsch R, 2007)

Weitere präklinische Studien stellten eine Synergie zwischen Trastuzumab und Gefitinib (ein EGFR Tyrosinkinasehemmer) fest. Diese Synergie führt zu einer kompletten Remission von HER-2-überexprimierten Brustkrebs bei Xenotransplantation. (Normanno N, 2002) Auf Grund dieser Erkenntnis, führte Arteaga et al. eine Phase II-Studie bei HER2 positiven Brustkrebspatientinnen durch. Diese Studie musste bei der ersten Zwischenauswertung aufgrund zu geringer Unterschiede geschlossen werden. Da durch einen indirekten Vergleich festgestellt wurde, dass diese Kombination antagonistisch wirken könnte. (Arteaga CL, 2008)

8 Derzeitige Testmethoden

Derzeit wird der HER-2 Status immunhistochemisch und/oder durch Genamplifikationstest wie fluorescence in situ hybridisation (FISH) (Pauletti G, 2000; Jimenez RE, 2000; Lebeau A, 2001) oder chromogenic in situ hybridisation (CISH) (Tanner M, 2000) nachgewiesen.

Die FISH ist eine Technik, die es ermöglicht, spezifische Nukleinsäuresequenzen in einem Zellpräparat sichtbar zu machen. Hierbei werden markierte DNA-Sonden direkt auf Zell- oder Gewebepreparaten hybridisiert und durch Fluoreszenzsignale in der Metaphase oder Interphase sichtbar gemacht. Diese können dann als farbige Punkte im Fluoreszenz-Mikroskop erkannt werden. Dadurch kann, z.B., an einem Zellkern nachgewiesen werden, ob der gesuchte Chromosomenabschnitt in normaler Anzahl vorliegt. Die angewandten DNA-Sonden decken unterschiedlich große Bereiche der Chromosomen ab und finden bei unterschiedlichen Fragestellungen Einsatz. (Mehnert K, 2008)

Die FISH Technik findet häufig in der Krebsforschung und –diagnostik Anwendung. Der Nachweis einer Amplifikation eines Gens, wie z.Bsp. des *HER-2/neu* Onkogens des Mammakarzinoms ist von prognostischer Bedeutung, da eine Amplifikation eines Gens mit der Überexpression des entsprechenden Proteins assoziiert ist.

Die American Society of Clinical Oncology (ASCO) und das College of American Pathologists (CAP) erstellten 2007 klinisch-praktische Leitlinien zur Beurteilung des HER-2 Status beim Mammakarzinom. Wichtig ist, dass die Übereinstimmung verschiedener Tests nicht gleichzeitig auch die richtige Diagnose bedeutet. Um die Ergebnisse verschiedener Tests vergleichen zu können, ist ein Vergleich mit einem absolut aussagekräftigen Testverfahren nötig. Da es einen solchen Test momentan noch nicht gibt, ist das Ansprechen der Patientinnen auf eine anti-HER-2 Therapie nicht sicher vorherzusagen. (Wolff AC, 2007)

8.1 HER-2 Positivität

Laut US FDA, verschiedener Experten, Studien und Protokolle ist der HER-2 Test positiv zu bewerten, wenn in der IHC mehr als 30% der Zellen eine vollständige Membranfärbung aufweisen (Score 3+). Bei der FISH Analyse ist der HER-2 Test positiv, wenn das *HER-2* Gen amplifiziert ist (durchschnittlich mehr als 6,0 *HER-2* Genkopien/Zellkern bei Testsystemen ohne interne Kontrollprobe) oder der *HER-2/CEP17* Quotient mehr als 2,2 ergibt (CEP17 ist der zentromere Nachweis für das Chromosom 17, auf welchem das *HER-2* Gen lokalisiert ist). Anfangs wurden die Ergebnisse aus der FISH nur mit positiv oder negativ bewertet. Da es jedoch auch fragliche Resultate gibt, wurden die Bewertungskriterien genauer definiert. (Persons DL, 2006; Dal Lago L, 2006; Vera-Roman JM, 2004)

8.2 Fragliche HER-2 Ergebnisse

Zellen, bei denen eine schwache bis mäßige Membranfärbung in der IHC auftritt, werden mit Score 2+ bewertet. (Owens MA, 2004) Hierbei ist in mehr als 10% der Zellen eine schwache bis mäßige, jedoch vollständige Membranfärbung zu erkennen. (Tubbs RR, 2001)

Bei der FISH Analyse beträgt der *HER-2/CEP17* Quotient zwischen 1,8 und 2,2 oder es gibt durchschnittlich zwischen 4,0 und 6,0 *HER-2* Genkopien/Zellkern. (Persons DL, 2006; Dal Lago L, 2006; Vera-Roman JM, 2004) Wichtig ist, dass Patientinnen mit einem *HER-2/CEP17* Quotient von 2,0 bis 2,2 als positiv beurteilt werden und für eine adjuvante Trastuzumab Therapie in Frage kommen. Eine Polysomie 17 wurde in circa 8 % beobachtet. Meistens bei Fällen, welche zwischen 4,0 und 6,0 *HER-2* Genkopien aufwiesen. (Downs-Kelly E, 2005; Ma Y, 2005) Fragliche IHC Proben müssen mittels FISH überprüft und bestätigt werden. Sollte dies auch wieder ein fragliches Ergebnis bringen, wird die IHC entweder wiederholt oder man zählt die Genanzahl in den Zellen erneut aus. (Wolff AC, 2007)

8.3 HER-2 Negativität

Bei der IHC wird ein HER-2 negatives Ergebnis mit Score 0 oder 1+ definiert. Es kommt zu keiner Färbung bzw. nur zu geringer inkompletter Membranfärbung. Bei der FISH beträgt der *HER-2/CEP17* Quotient weniger als 1,8 bzw. weniger als 4 Genkopien/Zellkern. (Wolff AC, 2007)

Auch wenn keine *HER-2* Genamplifikation mittels FISH nachgewiesen wurde, besteht die Möglichkeit einer geringen Überexpression von HER-2, welche in der IHC nachgewiesen werden kann. (Slamon DJ G. W., 1989) Die US Food and Drug Administration (FDA) empfiehlt, dass alle Gewebeproben, welche für eine HER-2 Testung herangezogen werden in einer 10%igen Formalinlösung (neutral gepuffert) für 6 bis maximal 48 Stunden fixiert werden. Beträgt die Fixationszeit mehr als 48 Stunden, könnte es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. (Zarbo RJ, 2003; Hammond ME, 2003)

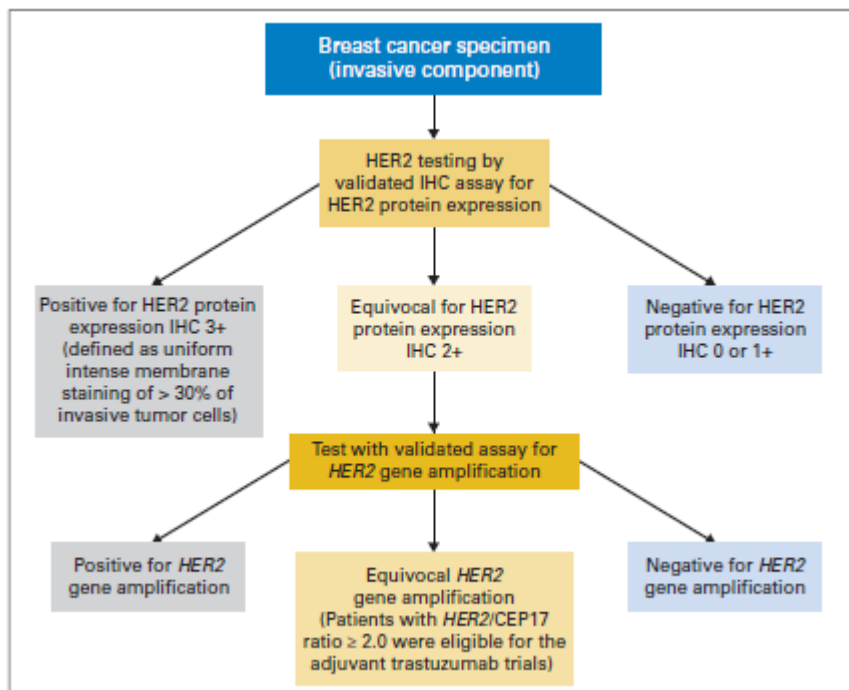


Abbildung 4: Algorithmus für IHC

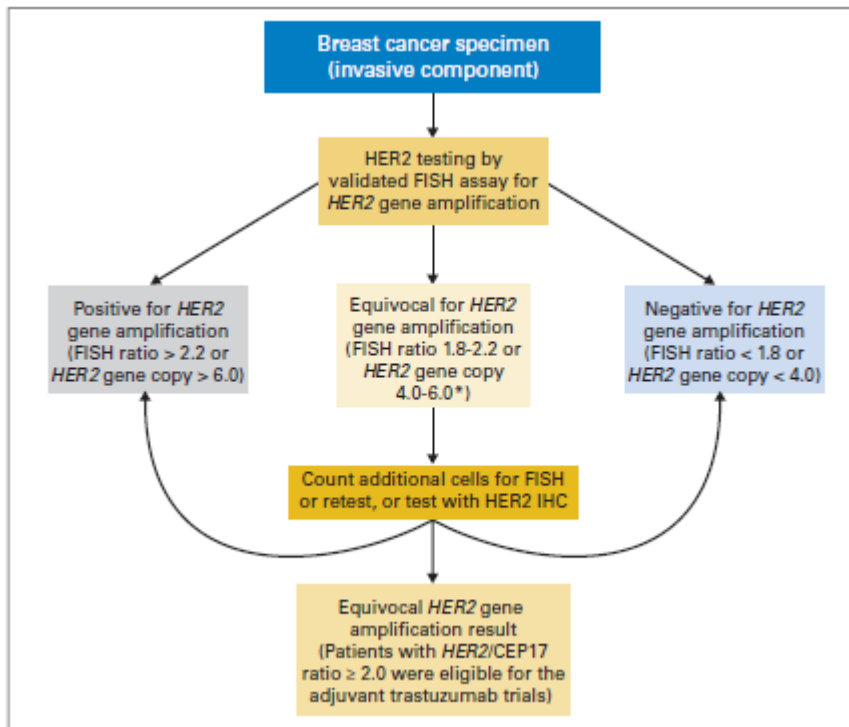


Abbildung 5: Algorithmus für FISH

8.4 HercepTest

Die Firma DakoCytomation bietet unter den Namen „HercepTest™“ einen semiquantitativen immunhistochemischen Test zum Nachweis einer HER-2 Überexpression beim Mammakarzinom an. Dieser Test dient zur Feststellung des HER-2 Status und als Vorbedingung für eine Therapie mit Trastuzumab (Herceptin™). Der HercepTest wurde auch in den FDA-Zulassungsstudien für Herceptin verwendet. (Dako Denmark, 2002)

Folgenden Kriterien sind zu berücksichtigen:

Färbung an der Zellmembran	Score	HER-2 Überexpression Bewertung
Es kommt zu keiner Färbung der Membran	0	Negativ
Schwache Membranfärbung bzw. nur teilweise Färbung der Zellmembran	1+	Negativ
Bei bis zu 10 % der Zellen tritt eine schwache bis mäßige jedoch vollständige Membranfärbung auf	2+	Fraglich positiv
Bei mehr als 30% der Zellen tritt eine starke, vollständige Membranfärbung auf	3+	Positiv

Tabelle 1: Kriterien für die Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung von HER-2 an der Zellmembran

Pathway™ HER-2/neu Antibody

Pathway Anti-HER-2/neu ist ein Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Klon 4B5), welcher sich gegen den inneren Teil des c-erbB-2 Onkoproteins (HER-2) richtet. (Ventana Medical Systems, 2009)

8.5 Prinzip des HER-2 Immunscoreings beim Magenkarzinom

Alle Gewebeproben, sowohl Biopsien als auch Resektate wurden in der klinischen Phase III Studie Trastuzumab on gastric adenocarcinoma (ToGA) sowohl immunhistologisch als auch mittels in-situ Hybridisierung untersucht. Dabei kam ein modifiziertes Scoring zum Einsatz. (Hofmann M, 2008) Dies unterscheidet sich in 2 zentralen Punkten vom Scoring des Mammakarzinoms.

1.) Eine HER-2 Positivität ist hauptsächlich in drüsig-intestinal differenzierten Tumoren oder beim Mischtyp nachweisbar. Eine HER-2 Positivität beim diffusen Typ wurde in 5% der Fälle festgestellt. Weiters sind reine Siegelringzellkarzinome meist vollständig negativ. (Rüschoff J, 2010)

2.) In nahezu jedem dritten fortgeschrittenem Magenkarzinom ist die HER-2 Positivität auf Protein- und Gen-Ebene heterogen (< 30% positive Tumorzellen) oder nur fokal ausgeprägt. (Rüschoff J, 2010) In der ToGA Studie ergab sich für Biopsien eine HER-2 Positivitätsrate von 22%. (Bang Y, 2009)

8.6 HER-2 Testung beim Magenkarzinom mittels ISH

Der Nachweis der Genamplifikation erfolgt analog zu den Regeln beim Mammakarzinom: es werden 20 auswertbare Zellen gezählt und dann aus dem Quotienten der Summe aller Gen-spezifischen Signale und der Summe aller Chromosom 17-spezifischen Signale das Verhältnis bestimmt. Circa 7,5% der IHC 0/1+ Tumoren zeigten zwar eine Amplifikation, die aber nur niedriggradig ausgeprägt war. Immunhistochemisch stark überexprimierende Zellen wiesen in über 90% der Fälle eine hohe Genamplifikation auf. (Rüschoff J, 2010)

Aufgrund der aktuellen Zulassung seitens der europäischen Arzneimittelagentur (EMA), kann Trastuzumab in Kombination mit Capecitabin (Vorstufe von 5-Fluorouracil) oder 5-Fluorouracil (Zytostatikum) und Cisplatin (Zytostatikum) für das metastasierte Adenokarzinom des Magens und der gastrointestinalen Übergangszone eingesetzt werden.

Bei der Testung des Magenkarzinoms ist die Immunhistochemie das primäre Testverfahren, die FISH Analyse wird nur zur Absicherung des IHC 2+ Befundes herangezogen, da nur eine HER-2 Protein Überexpression und nicht eine HER-2 Gen Amplifikation mit einem Therapieansprechen assoziiert ist. (Rüschoff J, 2010)

8.7 Immunoscoreing beim Magenkarzinom

Eine einfache Übertragung der HER-2 Testkriterien von Mamma- auf das Magenkarzinom ist mit einer hohen falsch-nagtiv-Rate verbunden. Die wesentlichste Änderung im Unterschied zur Beurteilung des Mammakarzinoms, betrifft den Wegfall der ringförmigen – kompletten - Färbung als Voraussetzung für die Festlegung auf einen IHC Score 2+ oder IHC Score 3+. Die Anwendung des Mammascorings bei Magenkarzinom dürfte zu einer circa 50%igen falsch-negativ-Rate führen. Weiters besteht auch das Risiko einer falsch-positiven Beurteilung. Es sollten daher nur validierte Tests verwendet werden, was für die von der FDA zugelassene Testplattformen (HercepTest, DAKO und Pathway, Roche-Ventana) spricht. (Rüschoff J, 2010)

8.8 ISH Analyse

In bis zu einem Drittel der Magenkarzinome ist, im Gegensatz zum Mammakarzinom, eine heterogene Genamplifikation zu erwarten. Dies lässt sich unter anderem durch den Anteil von bis zu 30% gemischten Tumortypen beim Magenkarzinom erklären. Beim intestinalen Typ können aber auch amplifizierte und nicht-amplifizierte Tumorareale nebeneinander vorkommen. Aus diesem Grund ist ein präzises Durchsuchen des gesamten Tumors erforderlich, damit amplifizierte Klone nicht übersehen werden. (Rüschoff J, 2010)

Interessant ist auch, dass laut ToGA Studie, Karzinome am ösophagogastralen Übergang im Vergleich zum distalen Magenkarzinom (Antrum), eine etwa doppelt so hohe HER-2 Positivität (30% versus 16%) aufwiesen. Diese Erkenntnis ist ebenfalls auf den unterschiedlichen Anteil intestinaler Tumortypen zurückzuführen. (Rüschoff J, 2010)

Noch nicht gesichert ist eine eigenständige prognostische Bedeutung von HER-2/neu beim Magenkarzinom.

Warum die Patientinnen mit metastasiertem Magenkarzinom von einer Therapie mit Trastuzumab profitieren, wenn die Positivität nur fokal, also < 10 - 30% ausgeprägt ist, ist noch ungeklärt. Es wäre auch möglich, dass die Daten zum Magenkarzinom auch zu einem Überdenken der Beurteilungskriterien beim Mammakarzinom führen. (Gilcrease MZ, 2009)

Die HER-2 Diagnostik des Magenkarzinoms unterscheidet sich in zwei wesentlichen Punkten von der Diagnostik des Mammakarzinoms. FISH und IHC sind nicht gleichberechtigt. Primär erfolgt eine immunhistochemische Testung, wobei nur bei IHC Score 2+ eine zusätzliche ISH Prüfung erforderlich ist. Die Unterscheidung liegt auch in der Beurteilung der HER-2 Immunhistochemie, da beim Magenkarzinom auch inkomplette Färbungen gewertet werden. (Rüschoff J, 2010)

Färbeintensität IHC-Score	Resektat- Beurteilung	Biopsie- Beurteilung	HER-2 Status
0	Keine Reaktivität oder Membranfärbung in < 10% der Tumorzellen	Keine Reaktivität oder Membranfärbung in keiner (oder < 5) der Tumorzellen	Negativ
1+	Sehr schwache Membranfärbung in mind.10% der Tumorzellen	Sehr schwache Membranfärbung in Tumorzellgruppen unabhängig vom Prozentsatz (mind.5 Tumorzellen)	Negativ
2+	Schwache bis mittelgradige, komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung in mind.10% der Tumorzellen	Schwache bis mittelgradige, komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung unabhängig vom Prozentsatz (mind.5 Tumorzellen)	Grenzwertig (ISH Überprüfung erforderlich)
3+	Starke komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung in mind.10% der Tumorzellen	Starke komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung unabhängig vom Prozentsatz (mind. 5 Tumorzellen)	Positiv

Tabelle 2: Modifiziertes HER-2 Immuno-Scoring beim Mammakarzinom

9 Mögliche Ansatzpunkte für eine verbesserte HER-2 Prädiktion

Auf Basis der zuvor dargestellten Funktion der Tyrosinkinase, der Liganden, des HER-2 Downstream Pathways und dessen Einflussfaktoren, der derzeit bekannten Wirkmechanismen von anti-HER-2 Therapeutika, den bekannten Ursachen der anti-HER-2 Tumortherapieresistenz und den derzeitigen Testmethoden ergeben sich folgende mögliche Ansatzpunkte für eine verbesserte Prädiktion des Ansprechens:

9.1 An der Membran

Homodimere versus Heterodimere

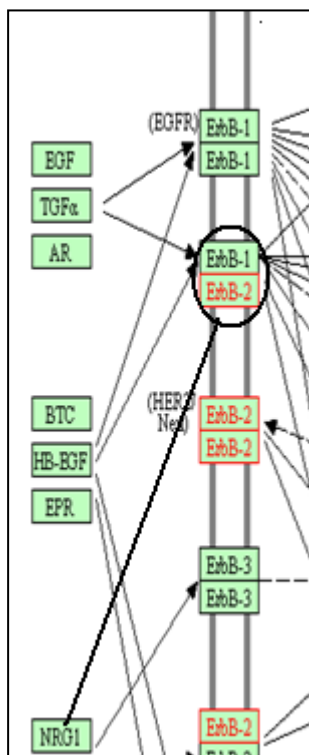


Abbildung 6: Dimere

Laut der Studie von Slamon, findet man eine HER-2 Überexpression in circa 30% aller Mammakarzinomen (Slamon DJ C. G., 1987), wobei diese auf eine Genamplifikation zurückzuführen ist. (Seshadri R., 1993; Slamon DJ G. W., 1989) In diesem Fall ist es möglich die Patientinnen mit monoklonalen Antikörpern (Trastuzumab) zu therapieren. Eine EGFR Überexpression ist, im Gegensatz dazu, fast niemals auf eine Genamplifikation zurückzuführen, sondern auf erhöhte Rezeptorsynthese. (Earp HS, 1995) In den Studien von Martinelli et al. wurde gezeigt, dass Homodimere schwächer als Heterodimere wirken (Martinelli E, 2009).

In den Studien von Campiglio et al. und Menard et al wurde gezeigt, dass eine HER-2/EGFR Co-Überexpression oder eine HER-2/HER-3 Co-Überexpression zu einer aggressiveren Tumorform führt.

Daher wäre es notwendig den oder die HER-2 Dimerisierungspartner in den individuellen Tumoren zu untersuchen, ob neben einer HER-2 Überexpression parallel eine EGFR Überexpression besteht, da dies zu einer stärkeren Heterodimerisierung führen dürfte. Dasselbe gilt für HER-3. Ein möglicher Testansatz stellt der Proximity Ligation Assay dar. Mit dieser Methode läßt sich ein in-vivo Naheverhältnis zweier Proteine nachweisen. (www.molmeth.org, 2008) Speziell in diesem Fall könnte eine Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor (TK-Inhibitor) Lapatinib von Vorteil sein, da Trastuzumab nur am HER-2 Rezeptor angreift. Lapatinib blockiert jedoch alle TK's der EGFR Familie.

MUC-4

Eine Überexpression von MUC-4 trägt zur Maskierung von Membranproteinen bei. Wird die Expression von MUC-4 jedoch durch RNA Interferenz herabgesetzt, wird die Bindung von Trastuzumab erhöht. (Nagy P, 2005) Daher wäre eine Messung der MUC-4 Expression von Vorteil, bevor eine Therapie mit Trastuzumab begonnen wird, da dadurch die Bindung von Trastuzumab an den HER-2 Rezeptor vorhergesagt werden kann.

9.2 Liganden

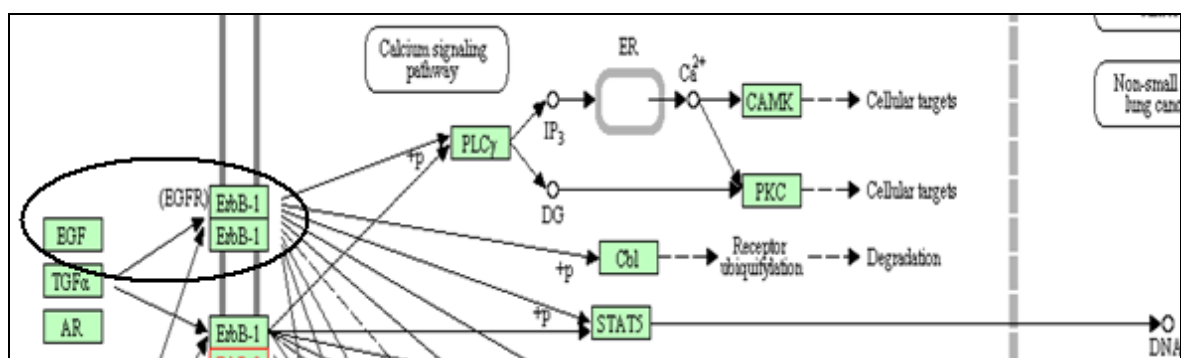


Abbildung 7: Liganden

Es wurde festgestellt, dass HER-2 plus EGFR mit Neuregulin als Ligand die stärkste Kombination ergibt. (Martinelli E, 2009) Diese Tatsache wäre ein weiterer interessanter Testansatz. Speziell, ob im Tumorgewebe neben HER-2 und EGFR auch EGF oder andere Liganden überexprimiert werden.

EGF als Protein ist in 15-30% der invasiver Mammakarzinome erhöht. Die *EGF* mRNA in 83%. (Braun S, 2000; Gebauer G, 2001) Eine genauere Untersuchung der mRNA wäre sinnvoll, da diese anscheinend aussagekräftiger ist und so eine genauere Bestimmung möglich wäre.

Auch der Nachweis von erhöhtem TGF- α könnte ein interessanter Ansatzpunkt sein, da es in TGF- α positiven Zellen unter Trastuzumab zu keiner Verminderung der HER-2 Expression kommt. Daher könnte eine Trastuzumabresistenz auch mit einem TGF- α gekoppelten Mechanismus in Zusammenhang stehen. (Valabrega G, 2007) Eine Messung von TGF- α beziehungsweise genauere Studien in Zusammenhang mit HER-2 positiven Karzinomen wäre vielleicht auch ein möglicher Ansatzpunkt.

Interessant erscheint auch der Umstand, dass apokrine Mammakarzinome häufig (in ca. 40-50% - eigene Beobachtung) HER-2 und gleichzeitig Androgenrezeptoren überexprimieren. Auch hier könnte die genaue Bestimmung von Liganden zu einem verbesserten individuellen Testansatz führen.

9.3 HER-2 als immunologischer Angriffspunkt

Es werden 2 verschiedene Ansatzpunkte bezüglich der Therapie mit Trastuzumab unterschieden. Wird Trastuzumab alleine verabreicht, wird hauptsächlich die Tyrosinkinaseaktivität verhindert und somit die Proliferation des Karzinoms gehemmt. Dabei wird in den HER-2 Downstreampathway eingegriffen. Bei der Kopplung von Trastuzumab mit einem Konjugat steht die zytotoxische Wirkung im Vordergrund. In diesem Fall, ist die Wirkung vom HER-2 Downstreampathway unabhängig. Da sich das Vorhandensein einer ADCC von Trastuzumab in verschiedenen Studien (Gennari R, 2004; Repka T, 2003) als nicht gesichert darstellte, wären weitere Studien interessant, ob es Faktoren gibt, welche die ADCC beeinflussen. Zum Beispiel, HER-2 positive Mammakarzinome mit lymphozytärem Infiltrat versus HER-2 positive Mammakarzinome ohne lymphozytärem Infiltrat.

9.4 Im Zytoplasma

Laut Molina et al. blockiert Trastuzumab den Abbau der extrazellulären Domäne von HER-2 durch Hemmung der Metalloproteinkinaseaktivität. (Molina MA, 2001)

Eine Messung der Metalloproteinkinaseaktivität wäre sinnvoll um ein unterschiedliches Therapie-Ansprechverhalten abhängig von der Metalloproteinkinaseaktivität zu erkennen. Würde sich so eine Abhängigkeit bestätigen, könnte die Metalloproteinkinaseaktivität so zur weiteren Therapieplanung herangezogen werden.

9.5 Wachstumshinhibitoren-CDK`s

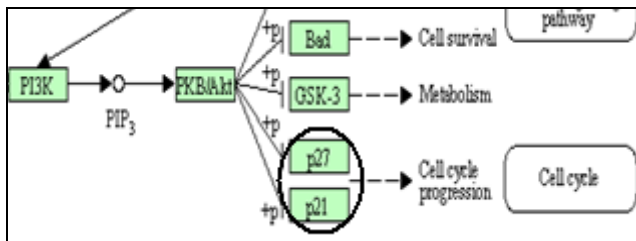


Abbildung 8: Wachstumsfaktoren

p27

Über sogenannte CDK`s wird der Zellzyklus reguliert. p27^{Kip1} ist ein sehr wichtiger Wachstumsinhibitor der CDK Familie, da er in der Lage ist verschiedene Cycline (A-CDK2, B-CDK2, D-CDK4 und E-CDK2) zu hemmen. Zellen, welche proliferieren können durch erhöhtes p27^{Kip1} dem Zellzyklus entkommen. Eine geringe Expression führt hingegen zu exzessiver Zellproliferation und Tumorenstehung. (Kalemi TG, 2007) Eine Messung von p27^{Kip1} bzw. das Eingreifen in die CDK Familie wäre daher bedeutsam um eine Chemoresistenz vorherzusagen.

p21

Die Rolle von p21 ist bei Mammakarzinomen umstritten. HER-2 überexprimierte Brustkrebszellen können durch erhöhte Expression von p21 Chemoresistenz induzieren. (Kalemi TG, 2007) Eine Bestimmung von p21 wäre daher sinnvoll.

PTEN

PTEN ist ein Tumorsupressorgen. (Fujita T, 2006) Studien zeigten, dass eine Resistenz von Trastuzumab in Zusammenhang mit der PTEN-Expression stehen kann. (Nagata Y, 2004; Di Cristofano A, 1998) Dies kann durch eine Mutation des *PTEN* Gens verursacht werden. (Garcia JM, 1999; Singh B, 1998)

PIP3 wird von PI3K produziert. Die Aktivität von PTEN führt zu Desphosphorylierung von PIP3. PIP3 ist wiederum der Hauptaktivator von AKT. Wird PTEN selektiv gehemmt, sinkt auch die Sensitivität von Trastuzumab. (Fujita T, 2006) AKT fördert verschiedene Gene, wie *p27* oder *p21*, welche in den Zellzyklus eingreifen und die Proliferation begünstigen. Eine Messung der PTEN Aktivität könnte eine Option sein, um das Ansprechen von Trastuzumab vorherzusagen. Ein Eingreifen in den PI3K/PIP3/PTEN Pathway wäre auch eine weiterer therapeutischer Ansatzpunkt.

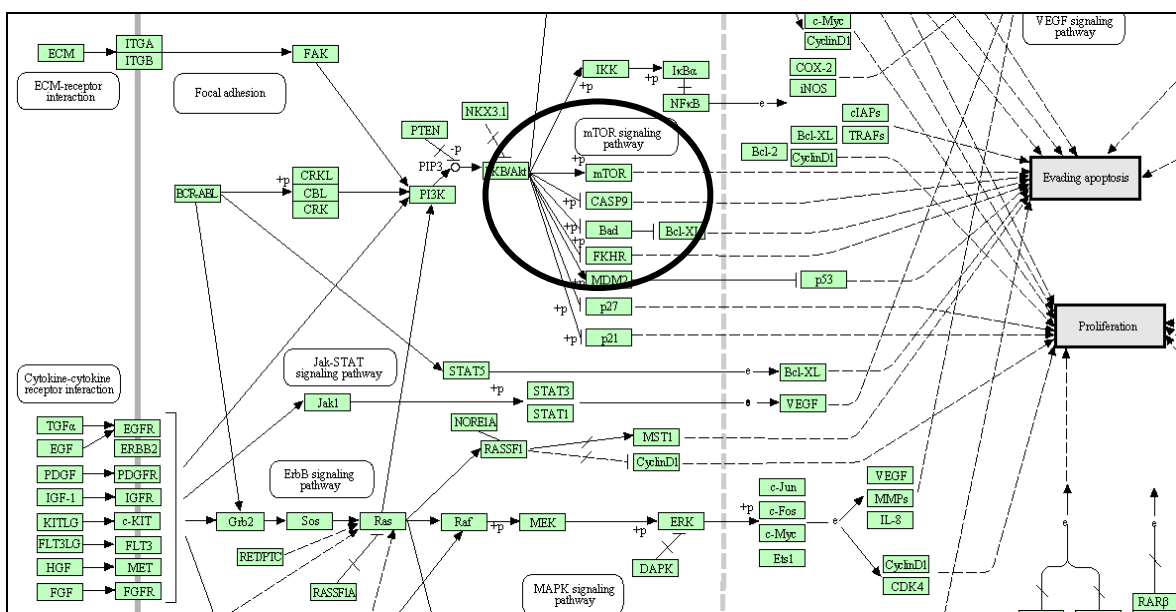


Abbildung 9: PTEN-Einfluss

PIK3CA

Patientinnen mit PIK3CA Mutationen bei HER-2 positiven Tumoren weisen eine schlechte Prognose auf. Dies wurde in einer Studie von Lerma et al. nachgewiesen. Diese Mutationen kamen in der Kinase Domäne (Exon 20) vor. Außerdem sind PIK3CA Mutationen häufiger als in triple negativen. Es wurde festgestellt, dass PIK3CA Mutationen auch mit einer p110 α (gehört zur Klasse I PIK3's) Überexpression verbunden sind. (Lerma E, 2008) Die Tatsache einer PIK3CA Mutation in Verbindung mit einer p110 α Überexpression wäre ein weiterer möglicher Punkt für eine prädiktive Testung, da dies leicht immunhistochemisch festgestellt werden könnte.

Heat shock-Protein 90

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt wäre die genauere Untersuchung des heat shock-Proteins 90. Dieses kontrolliert nämlich die Faltung von HER-2. (Bartsch R, 2007) Durch genauere Untersuchung des Proteins und deren Mechanismus in Bezug auf die kontrollierte Faltung von HER-2, könnte ein eventueller Ansatzpunkt bezüglich des Ansprechens auf eine Behandlung mit Trastuzumab gefunden werden.

9.6 Andere Wachstumsfaktoren

IGF-1 Rezeptor

Der IGF-1 Rezeptor ist ein transmembranöser Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher oftmals bei Mammakarzinomen nachgewiesen wird. Es wurde eine humane breast cell line SKBR3 entwickelt, die den IGF-1 Rezeptor überexprimiert. So konnte die Wirksamkeit von Trastuzumab beurteilt werden. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei einer anderen Zelllinie, bei der eine HER-2 Überexpression exogen induziert wurde. (Valabrega G, 2007) Bei IGF-1 Rezeptorüberexpression besteht eine Trastuzumab Resistenz (bitte diese Annahme überprüfen und Zitat einfügen). Daher wäre die Untersuchung des IGF-1 Rezeptors hinsichtlich Überexpression von Bedeutung.

VEG-Faktor

Eine Studie von Izumi et al. stellte fest, dass Trastuzumab die Produktion des VEG-Faktors in Tumorzellen (*in vitro*) verringert. Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen unabhängigen antiangiogenen Mechanismus von VEGF *in vivo* hinweisen. (Izumi Y, 2002) Daher wäre eine genauere Untersuchung des VEG-Faktors bei HER-2 überexprimierenden Mammakarzinomen vor einer Behandlung mit Trastuzumab möglicherweise sinnvoll um vielleicht Mutationen oder dergleichen des endothelialen Wachstumsfaktors herauszufinden. Dies könnte einen weiteren möglichen prädiktiven Ansatzpunkt ergeben.

Zusammenfassend konnte durch die Analyse des HER-2 Pathways und seiner zahlreichen Einflussfaktoren einige theoretische Ansatzpunkt für eine verbesserte Prädiktion gefunden werden. Eine Validierung dieser wäre in weiteren experimentellen und in weiterer Folge auch in klinischen Studien sinnvoll.

Literaturverzeichnis

Adams CW, A. D. (2006, Juni). Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunolog.Immunother.* , pp. 717-727.

Agus DB, A. R. (2002, August). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* , pp. 127-137.

Akiyama T, e. a. (1986). *Science* , pp. 1644-1646.

Albanell J, C. J. (2003). Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv.Exp.Med.Biol.* , pp. 253-268.

Arteaga CL, O. A. (2008, Oktober 01). 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.* , pp. 6277-6283.

Asanuma H, T. T. (2005, Dezember 01). Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.* , pp. 11018-11025.

Bachman KE, A. P. (2004, August). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer.Biol.Ther.* , pp. 772-775.

Bader AG, K. S. (2005, Dezember). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat.Rev.Cancer* , pp. 921-929.

Bang JI, V. C. (2010, August 28). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* , pp. 687-697.

Bang Y, C. H. (2009). Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *JCO 27:15s (ASCO 2009), Abstract No 4556* .

Barbareschi M, B. F. (2007, Oktober 15). Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin.Cancer Res.* , pp. 6064-6069.

Bartsch R, W. C. (2007). HER-2-positive breast cancer: hope beyond trastuzumab. *BioDrugs* , pp. 69-77.

- Baselga J, G. K. (2010, März 01). Phase II Trial of Pertuzumab and Trastuzumab in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer That Progressed During Prior Trastuzumab Therapy. *J.Clin.Oncol.* , pp. 1138-1144.
- Bilancia D, R. G. (2007, Juni). Lapatinib in breast cancer. *Annals of oncology* , pp. 26-30.
- Braun S, P. K. (2000, Feber 24). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N.Engl.J.Med.* , pp. 525-533.
- Burgess AW, C. H. (2003, September 2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell* , pp. 541-552.
- Burstein HJ, K. A. (2007, September 01). Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study. *Cancer* , pp. 956-972.
- Buttitta F, F. L. (2006, Feber). PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *J.Pathol.* , pp. 350-355.
- Cairns P, O. K. (1997, November 15). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* , pp. 4997-5000.
- Cameron D, C. M. (2008, Dezember). A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res. Treat.* , pp. 533-543.
- Campbell IG, R. S. (2004, November 01). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* , pp. 7678-7681.
- Campiglio M, A. S. (1999, Juni 15). Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer. *Journal of cellular biochemistry* , pp. 522-532.
- Caspari H, e. a. (2008, August 14). Wissenswertes zum ErbB2 (HER2) positivem Brustkrebs. *Curado* .
- Chalhoub N, B. S. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu.Rev.Pathol.* , pp. 127-150.
- Chan S, S. M. (2005, August 10). Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* , pp. 5314-5322.
- Cho HS, M. K. (2003, Feber 13). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* , pp. 756-760.

Clynes RA, T. T. (2000, April). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat.Med.* , pp. 443-446.

Cooley S, B. J. (1999, Okt. 1533). 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.* , pp. 1533-1541.

Dako Denmark. (2002). *Dako*. Retrieved Dezember 20, 2010, from http://www.dako.com/us/28630_19feb10_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_final.pdf

Dal Lago L, D. V. (2006, Oktober). Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol.Cancer.Ther.* , pp. 2572-2579.

Delord JP, A. C. (2005, Dezember). Selective inhibition of HER2 inhibits AKT signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma. *Ann.Oncol.* , pp. 1889-1897.

Di Cristofano A, P. B.-C. (1998, August 19). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature genetics* , pp. 348-355.

Diermeier S, H. G. (2005, April 01). 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.* , pp. 604-619.

Downs-Kelly E, Y. B. (2005, September). The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: A fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am.J.Surg.Pathol.* , pp. 1221-1227.

Downward J, e. a. (1998, Feber 08). Ras signalling and apoptosis. *Curr.Opin.Genet.Dev.* , pp. 49-54.

Earp HS, D. T. (1995, Juli). Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res.Treat.* , pp. 115-132.

Fornier MN, S. A. (2005, Feber). Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann.Oncol.* , pp. 234-239.

Franklin MC, C. K. (2004, April). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* , pp. 317-328.

Fujita T, D. H. (2006, Jänner 30). PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *British Journal of Cancer* , pp. 247-252.

Garcia JM, S. J. (1999, Oktober). Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast Cancer Res.Treat.* , pp. 237-243.

Garratt AN, B. S. (2000). Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* , pp. 987-996.

Gebauer G, F. T. (2001, August 15). Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J.Clin.Oncol.* , pp. 3669-3674.

Gennari R, M. S. (2004, September 01). Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin.Cancer Res.* , pp. 5650-5655.

German Breast Group, Breast International Group, Experimentales en Tumores Solidos. (2007, November 01). *German Breast Group*. Retrieved Juni 06, 2011, from <http://www.germanbreastgroup.de/studien/neoadjuvant/neo-allto/english-summary-.html>

Gilcrease MZ, W. W. (2009, Mai). Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. *Am.J.Surg.Pathol.* , pp. 759-767.

Gingras AC, K. S. (1998, Feber 15). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* , pp. 502-513.

Hammond ME, B. P. (2003, Juni). Standard reference material for Her2 testing: report of a National Institute of Standards and Technology-sponsored Consensus Workshop. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* , pp. 103-106.

Hofmann M, S. O. (2008, Juni). Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* , pp. 797-805.

Hudelist G, S. G. (2003, August). Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res.Treat.* , pp. 353-361.

Hudis CA, e. a. (2007, Juli 05). Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *N.Engl.J.Med.* , pp. 39-51.

Izumi Y, X. L. (2002, März 21). Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* , pp. 279-280.

- Jimenez RE, W. T. (2000, Jänner). Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod.Pathol.* , pp. 37-45.
- Kalemi TG, P. K. (2007, März-April). Expression of the HER family mRNA in breast cancer tissue and association with cell cycle inhibitors p21(waf1) and p27(kip1). *Anticancer Res.* , pp. 913-920.
- Karakas B, B. K. (2006, Feber 27). Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *British Journal of Cancer* , pp. 455-499.
- Kim ES, K. F. (2001, November). Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr.Opin.Oncol.* , pp. 506-513.
- Kirkegaard T, W. C. (2005, Oct). AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J.Pathol.* , pp. 139-146.
- Klapper LN, G. S. (1999, April 27). The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* , pp. 4995-5000.
- Klijn JG, B. P. (1993, Feber 13). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine reviews* , pp. 3-17.
- Kostler WJ, S. B. (2004, März 01). Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin.Cancer Res.* , pp. 1618-1624.
- Kute T, L. C. (2004, Feber). Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry Part A.* , pp. 86-93.
- Lambert JM, e. a. (2005, Oktober). Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Curr.Opin.Pharmacol.* , pp. 543-549.
- Lebeau A, D. D. (2001, Jänner 15). Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J.Clin.Oncol.* , pp. 354-363.
- Lerma E, C. L. (2008, August). Exon 20 PIK3CA mutations decreases survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. *Virchows Arch.* , pp. 133-139.
- Levine DA, B. F. (2005, April 15). Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin.Cancer Res.* , pp. 2875-2878.
- Lewis GD, L. J. (1996, März 15). Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res.* , pp. 1457-1465.

- Lewis Phillips GD, L. G. (2008, November 15). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* , pp. 9280-9290.
- Li DM, S. H. (1998, Dezember 22). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* , pp. 15406-15411.
- Li SY, R. M. (2006, März). PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res.Treat.* , pp. 91-95.
- Liang K, L. Y. (2006, September). Differential roles of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and akt1 expression and phosphorylation in breast cancer cell resistance to Paclitaxel, Doxorubicin, and gemcitabine. *Mol.Pharmacol.* , pp. 1045-1052.
- Louis DN, G. J. (1995, Oktober 11). A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet.* , pp. 412-415.
- Lu Y, Z. X. (2001, Dezember 19). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J.Natl.Cancer Inst.* , pp. 1852-1857.
- Ma Y, L. L. (2005, Juni 15). Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin.Cancer Res.* , pp. 4393-4399.
- Margolis B, S. E. (1994, Dezember). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J.Am.Soc.Nephrol.* , pp. 1288-1299.
- Martinelli E, D. P. (2009, Oktober). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical and experimental immunology* , pp. 1-9.
- Mayo LD, D. D. (2001, September 25). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* , pp. 11598-11603.
- Mehnert K, e. a. (2008). *Genetikum*. Retrieved Jänner 14, 2010, from <http://www.genetikum.de/labor/untersuchungsverfahren/mlpa>
- Menard S, T. E. (2000, Feber). Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J.Cell.Physio.* , pp. 150-162.
- Meuillet EJ, I. N. (2004). In vivo molecular pharmacology and antitumor activity of the targeted Akt inhibitor PX-316. *Oncol.Res.* , pp. 513-527.
- Molina MA, C.-S. J. (2001, Juni 15). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* , pp. 4744-4749.

Mroczkowski B, R. M. (1989, Juli 09). Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol.Cel.Biol.* , pp. 2771-2778.

Müller-Tidow C, K. U. (2007, Jänner 21). *Tyrosinkinase als Ziele neuer onkologischer Therapien: Aussichten und Probleme*. Retrieved Juli 03, 2010, from *Ärztblatt*: <http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?src=heft&id=55619>

Nagata Y, L. K. (2004, August 06). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* , pp. 117-127.

Nagy P, F. E. (2005, Jänner 15). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* , pp. 473-482.

Nahta R, Y. L. (2005, Dezember 01). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* , pp. 11118-11128.

NCBI Gene. (n.d.). *ERBB2 v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) [Homo sapiens]*. Retrieved Dezember 09, 2010, from Pubmed: <http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>

NCBI Gene. (n.d.). *ERBB3 v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) [Homo sapiens]*. Retrieved Mai 03, 2011, from Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2065>

NCBI Gene. (n.d.). *GRB10 growth factor receptor-bound protein 10 [Homo sapiens]*. Retrieved November 14, 2010, from Pubmed: <http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6654>

NCBI Gene. (n.d.). *MAPK1 mitogen-activated protein kinase 1 [Homo sapiens]*. Retrieved Dezember 07, 2010, from Pubmed: <http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5594>

NCBI Gene. (n.d.). *MYC v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) [Homo sapiens]*. Retrieved November 15, 2010, from Pubmed: <http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609>

NCBI Gene. (n.d.). *PTEN phosphatase and tensin homolog [Homo sapiens]*. Retrieved 12 01, 2010, from Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5728>

NCBI Gene. (n.d.). *PTK2 PTK2 protein tyrosine kinase 2 [Homo sapiens]*. Retrieved November 20, 2010, from Pubmed: <http://han.medunigratz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5747>

NCBI Gene. (n.d.). *SRC v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) [Homo sapiens]*. Retrieved November 14, 2010, from Pubmed: <http://han.medunigraz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6714>

NCBI Gene. (n.d.). *STAT5A signal transducer and activator of transcription 5A [Homo sapiens]*. Retrieved November 15, 2010, from Pubmed: <http://han.medunigraz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6776>

Neve RM, H. T. (2002, Juli 04). Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* , pp. 4567-4576.

Normanno N, C. M. (2002, Jänner 13). Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. *Ann.Oncol.* , pp. 65-72.

Olayioye MA, e. a. (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* , pp. 385-389.

Olayioye MA, N. R. (2000, Juli 03). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* , pp. 3159-3167.

Osborne CK, H. B. (1980, Juli). Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture. *Cancer research* , pp. 2361-2366.

Owens MA, H. B. (2004, April). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin.Breast Cancer* , pp. 63-69.

Pauletti G, D. S. (2000, November 01). Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J.Clin.Oncol.* , pp. 3651-3664.

Pegram M, H. S. (1991, April 01). Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* , pp. 2241-2251.

Perez-Tenorio G, A. L. (2007, Juni 15). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin.Cancer Res.* , pp. 3577-3584.

Perou CM, S. T. (2000, August 17). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* , pp. 747-752.

Perrotte P, M. T. (1999, Feber). Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin.Cancer Res.* , pp. 257-265.

Persons DL, T. R. (2006, März). HER-2 fluorescence in situ hybridization: results from the survey program of the College of American Pathologists. *Arch.Pathol.Lab.Med.* , pp. 325-331.

Polakis P, e. a. (2005, August). Arming antibodies for cancer therapy. *Curr.Opin.Pharmacol.* , pp. 382-387.

Press MF, C.-C. C. (1990). Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal. *Oncogene* .

Repka T, C. E. (2003, Juli). Trastuzumab and interleukin-2 in HER2-positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Clin.Cancer Res.* , pp. 2440-2446.

Risinger JI, H. A. (1997, November 01). PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res.* , pp. 4736-4738.

Ritter CA, P.-T. M. (2007, August 15). 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.* , pp. 4909-4919.

Robinson DR, W. Y. (2000, November 20). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* , pp. 5548-5557.

Rowinsky EK, S. G. (2004, August 01). Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J.Clin.Oncol.* , pp. 3003-3015.

Rüschhoff J, N. I. (2010, Feber). *HER2 Diagnostik beim Magenkarzinom Was ist anders im Vergleich zum Mammakarzinom?* Retrieved Jänner 12, 2011, from www.bv-pathologie.de: http://www.bv-pathologie.de/dokumente/prof_rueschoff_vortrag.pdf

Saal LH, H. K. (2005, April 01). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* , pp. 2554-2559.

Salomon DS, G. W. (1997, April). Perspectives on the EGF family and the mammary gland. *J.Mammary Gland Biol.Neoplasia* , p. 199.

Sarup JC, J. R. (1991, Juni). Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul.* , pp. 72-82.

- Scaltriti M, C. S. (2010, Mai 01). Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clin.Cancer Res.* , pp. 2688-2695.
- Scaltriti M, R. F. (2007, April 18). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J.Natl.Cancer.Inst.* , pp. 628-638.
- Seshadri R., F. F. (1993, Oktober 11). Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J.Clin.Oncol.* , pp. 1936-1942.
- Singh B, I. M. (1998, Feber 21). Sporadic breast cancers exhibit loss of heterozygosity on chromosome segment 10q23 close to the Cowden disease locus. *Genes Chromosomes Cancer* , pp. 166-171.
- Slamon DJ, C. G. (1987, Jänner 09). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* , pp. 177-182.
- Slamon DJ, G. W. (1989, Mai 12). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* , pp. 707-712.
- Slamon DJ, L.-J. B. (2001, März 15). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N.Engl.J.Med* , pp. 783-792.
- Sliwkowski MX, e. a. (2004). *Diseases of the Breast. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins*; Retrieved Mai 09, 2010, from Resarchherpathways: <http://www.researchherpathways.com/researchherpath/her2/dysregulation/index.m>
- Sorlie T, T. R. (2003, Juli 08). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* , pp. 8418-8423.
- Spector NL, B. K. (2009, Dezember 01). Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J.Clinic.Oncol.* , pp. 5838-5847.
- Spector NL, X. W. (2005, April 10). Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J.Clin.Oncol.* , pp. 2502-2512.
- Stein RC, e. a. (2001, September). Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocr. Relat. Cancer* , pp. 237-248.
- Steinthorsdottir V, S. H. (2004, November 10). Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene* , pp. 97-105.

Stephens L, W. R. (2003). *Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer*. Retrieved März 12, 2010, from Springer Link: <http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.springerlink.com/content/9wp7q22rr1397120/>

Tanner M, G. D. (2000, November). Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am.J.Pathol.* , pp. 1467-1472.

Tashiro H, B. M. (1997, Dezember 15). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* , pp. 3935-3940.

Tubbs RR, P. J. (2001, Mai 15). Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J.Clin.Oncol.* , pp. 2714-2721.

Valabrega G, A. M. (2007, Juni). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann.Oncol.* , pp. 977-984.

Valabrega G, M. F. (2005, April 21). TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation. *Oncogene* , pp. 3002-3010.

Vartanian T, F. G. (1999, Jänner 19). Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* , pp. 731-735.

Ventana Medical Systems. (2009). www.ventanamed.com. Retrieved Juni 18, 2011, from <http://www.ventanamed.com/documents/PATHWAYHER-2%284B5%29brochure.pdf>

Vera-Roman JM, R.-M. L. (2004, Juni). Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch.Pathol.Lab.Med.* , pp. 627-633.

Vivanco I, S. C. (2002, Juli 02). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat.Rev.Cancer* , pp. 489-501.

Walker RA, D. S. (1999, Jänner). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Breast cancer research and treatment* , pp. 167-176.

Whyte DB, H. S. (2006, Feber 10). Correlation of PIK3Ca mutations with gene expression and drug sensitivity in NCI-60 cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* , pp. 469-475.

Witton CJ, R. J. (2003, Juli). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *The Journal of Pathology* , pp. 290-297.

Wolff AC, H. M. (2007, Jänner 01). 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.* , pp. 118-145.

www.abstract2view.com. (2010, Dezember 10). Retrieved Juni 19, 2011, from http://www.abstracts2view.com/sabcs10/view.php?nu=SABCS10L_291

www.clinicaltrials.gov. (2011, April 14). Retrieved Juni 12, 2011, from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00490139?term=neo+altto&rank=2>

www.molmeth.org. (2008, Mai 30). Retrieved Juni 21, 2011, from <http://www.molmeth.org/protocols/5Y4W2B>

Yakes FM, C. W. (2002, Juli 15). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt 1s required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Research* , pp. 4132-4141.

Yang Y, S. E. (1995, Oktober 15). Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J.Cell.Biol.* , pp. 215-226.

Yarden Y, S. M. (2001, Feber). Untangling the ErbB signalling network. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* , pp. 127-137.

Yen L, Y. X. (2000, Juli 20). Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* , pp. 3460-3490.

Zarbo RJ, H. M. (2003, Mai). Conference summary, Strategic Science symposium. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch.Pathol.Lab.Med.* , pp. 549-553.