

Sylwia Dębska

Received: 14.10.2011

Accepted: 02.12.2011

Published: 30.12.2011

## Leczenie systemowe chorych na raka piersi z nadekspresją HER2. Część I

Systemic treatment of HER2+ breast cancer patients. Part 1

Системное лечение больных раком груди со сверхэкспрессией HER2. Часть I

Klinika Chemioterapii Nowotworów Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Kierownik Kliniki: dr hab. n. med. Piotr Potemski, prof. UM

Correspondence to: Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika w Łodzi, ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź, tel.: 42 689 54 31, faks: 42 689 54 32

Source of financing: Department own sources

### Streszczenie

W Polsce od 40 lat obserwuje się rosnącą umieralność z powodu raka piersi. Poszerzająca się wiedza o biologii raka piersi nie pozwala obecnie postrzegać tego nowotworu jako jednorodnej jednostki chorobowej. Różne podtypy raka piersi – luminalny A (ER+ lub PR+ i HER2-), luminalny B (ER+ lub PR+ i HER2+), HER2-zależny (ER- i PR- i HER2+) czy tzw. potrójnie ujemny/podstawny (ER- i PR- i HER2-) – charakteryzują się odmiennym przebiegiem klinicznym i rokowaniem, a także wymagają indywidualnej strategii terapeutycznej. Receptor HER2 należy do rodziny ludzkich receptorów dla czynników wzrostu. Może ulegać ekspresji w różnych tkankach, gdzie zaangażowany jest we wzrost i różnicowanie komórek. Nadekspresja HER2 w komórkach raka piersi związana jest z gorszym rokowaniem, ale także z możliwością zastosowania u tych chorych terapii ukierunkowanych molekularnie anty-HER2. Szacuje się, że około 25% guzów piersi jest HER2-pozytywnych – u tych chorych należy rozważyć wdrożenie leczenia „celowanego”. Z tego względu w chwili obecnej standardowym elementem każdego badania histopatologicznego raka piersi powinna być immunohistochemiczna ocena ekspresji receptora HER2. U chorych z niejednoznacznym wynikiem badania IHC (HER2 2+) należy ocenić ilość kopii genu *HER2* w komórkach raka piersi metodą FISH. Tylko chore z nadekspresją receptora (HER2 3+) albo amplifikacją genu *HER2* kwalifikują się do leczenia ukierunkowanego molekularnie. Pierwszym lekiem z tej grupy jest przeciwciało monoklonalne trastuzumab, które po połączeniu z HER2 nie tylko blokuje procesy wewnątrzkomórkowe zależne od pobudzenia receptora, ale także uruchamia odpowiedź immunologiczną przeciw komórkom nowotworowym w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał.

**Słowa kluczowe:** rodzina receptorów HER, nadekspresja HER2, amplifikacja genu *HER2*, czynniki prognostyczne w raku piersi, trastuzumab, cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał

### Summary

In Poland, morbidity associated with breast cancer has been increasing over the past 40 years. Current advances in our understanding of breast cancer biology preclude considering this condition as a homogenous nosologic entity. Several subtypes of breast cancer: luminal A (ER+, PR+, HER2-), luminal B (ER+, PR+, HER2+), HER2-dependent (ER-, PR-, HER2+) and the so-called triple-negative or basic (ER-, PR-, HER2-) differ in clinical course and prognosis and require an individualized therapeutic approach. HER2 receptor is one of a family of human growth factor receptors. It may become expressed in different tissues, participating in growth and differentiation of cells. HER2 overexpression in breast cancer cells correlates with worse prognosis, but also enables implementation of targeted, anti-HER2 molecular therapies. As estimated, about 25% of breast tumors are HER2-positive and in these patients the use of “targeted” therapy should be considered. Therefore, at present, standard histological study of

breast cancer should include immunohistochemical assessment of HER2 receptor expression. Patients with equivocal result of the IHC study (HER2 2+) require quantitative analysis of *HER2* gene copies in cancer cells using the FISH technique. Only patients with HER2 receptor overexpression (HER2 3+) or *HER2* gene amplification are candidates for targeted molecular treatment. The first drug of this kind is monoclonal antibody trastuzumab, binding with the HER2 receptor and blocking HER2-dependent intracellular processes, while triggering a cytotoxic cellular antibody-dependent immune reaction directed against cancer cells.

**Key words:** HER receptor family, HER2 overexpression, *HER2* gene amplification, prognostic factors in breast cancer, trastuzumab, antibody-dependent cellular cytotoxic reaction

## Содержание

В Польше за последних 40 лет наблюдается растущая смертность в результате рака молочной железы. Расширяющиеся знания в области биологии РМЖ не позволяют в настоящий момент воспринимать эту опухоль, как однородную нозологическую единицу. Разные подтипы РМЖ – люминальный А (ER+ или PR+ и HER2-), люминальный В (ER+ или PR+ и HER2+), HER2-зависимый (ER- и PR- и HER2+) или так называемый трижды негативный/базальный (ER- и PR- и HER2-) – характеризуются отличительным клиническим течением и прогнозом, а также нуждаются в индивидуальной терапевтической стратегии. Рецептор HER2 принадлежит к семейству человеческих рецепторов факторов роста. Может подвергаться экспрессии в разных тканях, в которых он задействован в рост и дифференциацию клеток. Сверхэкспрессия HER2 в клетках РМЖ связана с более плохим прогнозом, но также с возможностью применения у этих больных терапии с молекулярным направлением анти-HER2. Оценивается, что около 25% опухолей грудной железы HER2-позитивны, у этих больных следует рассматривать применение „нацеленного” лечения. Ввиду этого в настоящий момент стандартным элементом каждого гистопатологического исследования в случае РМЖ должна быть иммуногистохимическая оценка экспрессии рецептора HER2. У больных с неоднозначным результатом исследования ИHC (HER2 2+) следует оценивать число копий гена *HER2* в раковых клетках грудной железы методом FISH. Только больные со сверхэкспрессией рецептора (HER2 3+) или с амплификацией гена *HER2* квалифицируются для молекулярно направленного лечения. Первым лекарственным средством из данной группы является моноклональное антитело трастузумаб, которое после соединения с HER2 не только блокирует внутриклеточные процессы, зависящие от стимулирования рецептора, но также вызывает иммунологический ответ против опухолевых клеток в механизме клеточной цитотоксичности, зависящей от антител.

**Ключевые слова:** семейство рецепторов HER, сверхэкспрессия HER2, амплификация гена *HER2*, факторы прогнозирования в РМЖ, трастузумаб, клеточная цитотоксичность зависящая от антител

## WSTĘP

**W**yróżnienie poszczególnych podtypów raka piersi w zależności od stanu receptorów hormonalnych i receptora HER2 spowodowało, że rak piersi nie jest już postrzegany jako jednorodna jednostka chorobowa, ale raczej jako heterogenna grupa chorób o różnym przebiegu i rokowaniu. Nadekspresja HER2 w komórkach raka piersi stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy. Stwierdzana jest u co czwartej kobiety z rozpoznaniem tego nowotworu. Badania translacyjne toczone się od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy to zidentyfikowano pierwsze receptory z rodziny HER, pozwoliły na poznanie ich struktury, funkcji i znaczenia w komórkach zdrowych i nowotworowych, a wreszcie doprowadziły do stworzenia leków ukierunkowanych na ten cel molekularny. Ich wprowadzenie do praktyki klinicznej poprawiło prognozę u chorych HER2-pozytywnych.

Niniejsza praca przybliża podstawy teoretyczne biologii receptorów HER oraz mechanizm działania przeciwciała trastuzumab – pierwszego leku ukierunkowanego molekularnie anty-HER2.

## INTRODUCTION

**D**iscernment of particular subtypes of breast cancer depending on their hormonal receptor status and presence of HER2 receptors resulted in a situation, where breast cancer is no longer perceived as a single and homogenous disease, but rather as a heterogenous group of conditions differing in clinical course and prognosis. HER2 overexpression in breast cancer cells is an unfavorable prognostic factor. It is seen in one in four women affected with this malignancy. Studies on translation undertaken since the '80s of the past century, when first representatives of the HER receptor family have been identified, enabled clarification of their structure, function and role in healthy and neoplastic cells, ultimately resulting in the development of drugs directed against this molecular target. Their introduction to clinical practice improved the prognosis in HER2-positive patients.

This paper reviews theoretical bases of HER receptor biology and mechanism of action of trastuzumab, the first anti-HER2 molecular drug.

## RODZINA RECEPTORÓW HER – BUDOWA, FUNKCJE, MECHANIZMY POBUDZENIA

Receptor HER2 – tak jak HER1 (EGFR), HER3 i HER4 – jest błonowym receptorem dla czynników wzrostu. Wspomniane receptory należą do jednej rodziny HER (*human epidermal growth factor receptors*)<sup>(1)</sup>. HER2 znany jest także jako ErbB2 (nazwa wywodzi się od homologicznego wirusowego onkogenu B ptasiej erythroblastozy), HER2/neu (człon nazwy *neu* nawiązuje do faktu, że pierwotnie onkogen zidentyfikowano w komórkach guzów u szczura wywodzących się z układu nerwowego – ang. *neural*), CD 340 (*cluster of differentiation 340*) lub p185 (co odpowiada masie cząsteczkowej receptora wynoszącej 185 kDa). Gen kodujący HER2 – protoonkogen *ERBB2* (*HER2*) – zlokalizowany jest w chromosomie 17. (17q21-22), a jego produkt białkowy został opisany w 1984 roku przez Weinberga i wsp.<sup>(2,3)</sup>

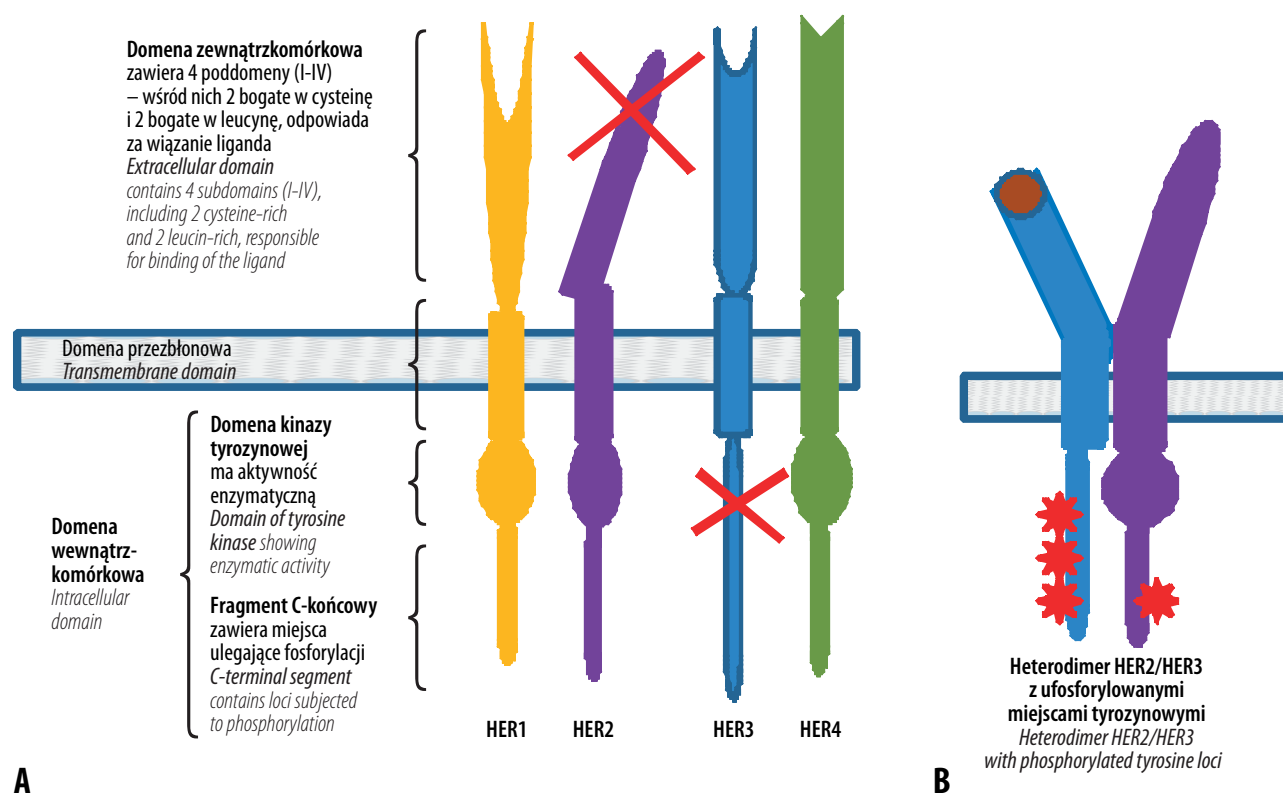
Receptory HER mają podobny schemat budowy i mechanizm aktywacji. Każdy receptor zawiera domenę zewnątrzkomórkową (*extracellular domain*, ECD), krótką hydrofobową domenę przezbłonową (*transmembrane domain*, TD) i część wewnątrzkomórkową<sup>(1,4-6)</sup>. Najistotniejsze odmienności obserwowane między receptorami HER to brak możliwości wiązania liganda przez receptor HER2 i brak aktywności kinazy tyrozynowej domeny wewnątrzkomórkowej receptora HER3<sup>(4)</sup>. Schemat budowy receptorów HER przedstawiono na rys. 1.

## HER RECEPTOR FAMILY – STRUCTURE, FUNCTION, AND MECHANISMS OF ACTION

Receptors HER1 (EGFR), HER2, HER3 and HER4 are membrane-based receptors for growth factors. These receptors belong to the family of human epidermal growth factor receptors<sup>(1)</sup>. HER2 is also known as ErbB2 (termed after homologous viral oncogene B of avian erythroblastosis), HER2/neu (the particle “neu” refers to the fact that initially this oncogene has been identified in murine neural tissue-derived tumors), CD 340 (cluster of differentiation 340) or p185 (refers to molecular mass of the receptor: 185 kDa). HER2-encoding gene – the *ERBB2* protooncogene – is located at the chromosome 17 (17q21-22) and its protein product has been first described in 1984 by Weinberg et al.<sup>(2,3)</sup>

HER receptors feature a similar structural pattern and activation mechanism. Each receptor is composed of an extracellular domain (ECD), a short hydrophobic transmembrane domain (TD) and intracellular part<sup>(1,4-6)</sup>. Most significant differences among HER receptors consist in lack of ligand binding by HER2 receptor and lack of activity of tyrosine kinase in intracellular domain of HER3 receptor<sup>(4)</sup>. Basic patterns of HER receptors are shown in fig. 1.

Binding of a ligand to ECD activates the receptor. Ligands for HER receptors are growth factors – different for particular receptor types<sup>(6-12)</sup>. Ligands for HER receptors are presented in fig. 2.



Rys. 1. Receptory rodziny HER. A. Schemat budowy receptorów HER. B. Przykład heterodimeru HER2/HER3 utworzonego po aktywowaniu receptora HER3 ligandem.

Fig. 1. Receptors of the HER family. A. Schematic structure of HER receptors. B. An example of HER2/HER3 heterodimer arising upon activation of HER3 receptor by a ligand

Połączenie liganda z domeną zewnątrzkomórkową aktywuje receptor. Ligandami dla receptorów HER są czynniki wzrostu – różne dla poszczególnych receptorów<sup>(6,12)</sup>. Ligandy receptorów HER prezentuje rys. 2.

Po przyłączeniu liganda konformacja domeny zewnątrzkomórkowej receptora ulega zmianie – nazywana jest wtedy konformacją otwartą i umożliwia połączenie go z innym receptorem z rodziny<sup>(13)</sup>. Może to być taki sam receptor (określa się to mianem homodimeryzacji) lub inny członek rodziny (heterodimeryzacja)<sup>(14,15)</sup>. Możliwe jest utworzenie 10 rodzajów dimerów, ale największy potencjał przekazywania sygnału mają heterodimery z udziałem receptora HER2<sup>(15)</sup>. HER2 jest preferowanym partnerem dimeryzacji dla pozostałych receptorów rodziny, a najbardziej efektywne w zakresie przekazywania sygnału połączenie tworzy z receptorem HER3<sup>(14)</sup>. Kolejny etap to pobudzenie domen wewnątrzkomórkowych, a dokładnie ich fragmentów o aktywności enzymatycznej kinaz tyrozynowych, które krzyżowo fosforylują c-końcowe fragmenty wewnątrzkomórkowe receptorów tworzących dimer<sup>(4,6,10)</sup>. Ten ostatni etap aktywacji receptorów umożliwia przekazanie pobudzenia do wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych, które z kolei przekazują informację do jądra komórkowego, uruchamiając transkrypcję genów warunkujących procesy życiowe komórki. Sieci wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału zależne od receptorów HER przedstawiono na rys. 2. Ostatecznym efektem aktywowania receptorów HER jest odpowiedź komórkowa polegająca na pobudzeniu proliferacji i migracji, uwolnieniu czynników angiogennych lub hamowaniu apoptozy<sup>(16)</sup>.

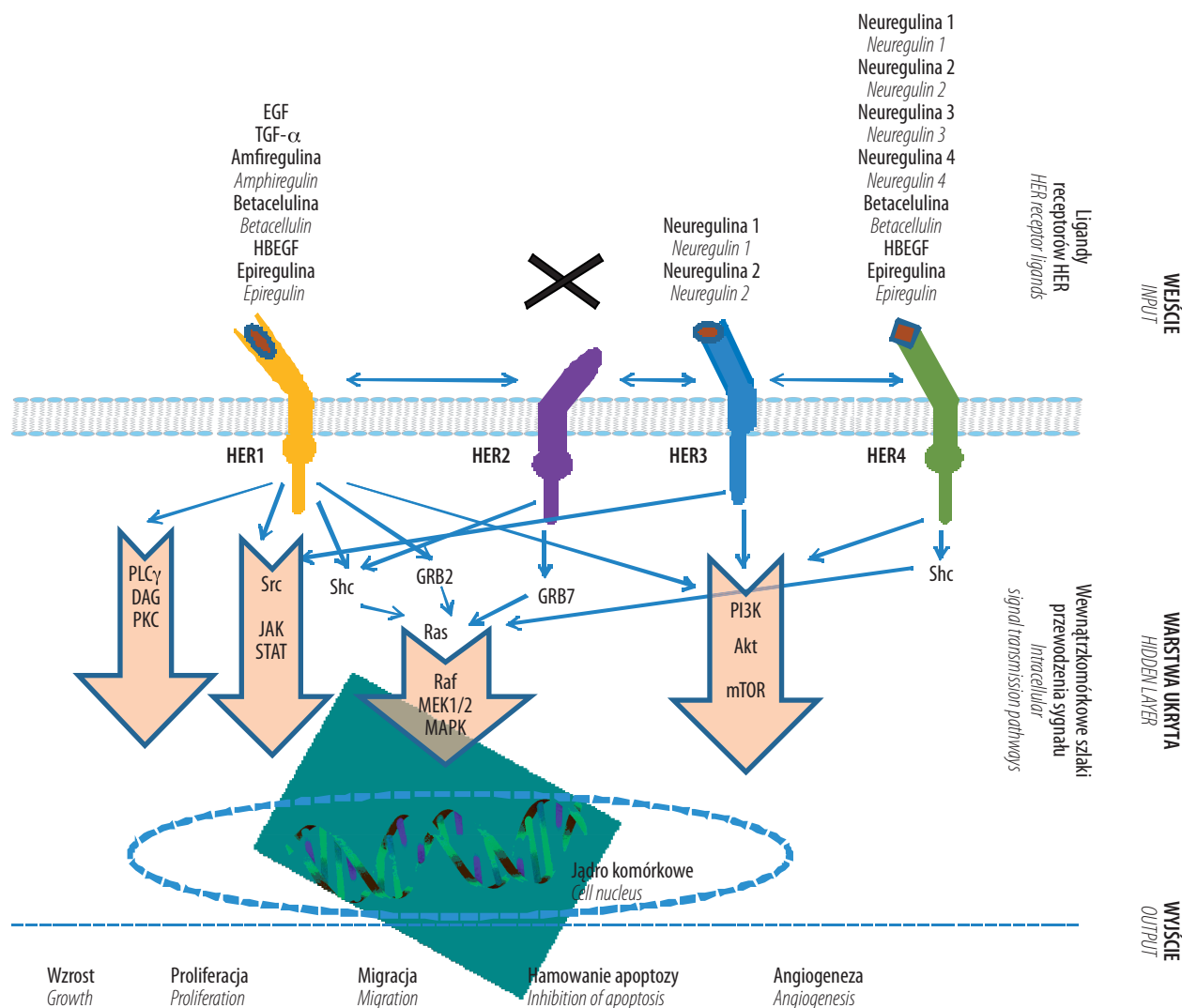
Nie zidentyfikowano dotychczas specyficznego liganda receptora HER2. Według niektórych autorów jego domena ECD pozostaje stale w otwartej konformacji umożliwiającej dimeryzację<sup>(13,17)</sup>. W przypadku HER2 dimeryzacja może zachodzić, gdy receptor ulega nadekspresji w błonie komórkowej<sup>(4,5)</sup> – przy pewnej krytycznej ilości receptorów równowaga przesuwana się od monomerów do dimerów. Ponadto w modelu guzów *neuroblastoma* i *glioblastoma* u szczurów zidentyfikowano zmutowany wariant receptora HER2 wykazujący stałą aktywność kinazy tyrozynowej. Mutacja dotyczy domeny przezbłonowej, w której w miejscu waliny 6643 występuje kwas glutaminowy (Val-6643>Glu)<sup>(18,19)</sup>. Według jednej z teorii HER2 ulega także aktywacji po proteolizie domeny zewnątrzkomórkowej, powstaje wtedy krótszy wariant receptora – p95 cechujący się stałą aktywnością enzymatyczną<sup>(20)</sup>. Nazwa białka wynika z faktu, że po uwolnieniu domeny ECD HER2 o masie 110 kDa pozostaje fragment 95 kDa obejmujący domenę przezbłonową i wewnątrzkomórkową<sup>(4,21)</sup>. Domena ECD jest uwalniana do płynu zewnątrzkomórkowego, a stamtąd do krwi, gdzie może być wykryta. Obserwacje kliniczne wskazują, że ECD w surowicy występuje u nie więcej niż 6% chorych na wczesnego raka piersi, u 25% chorych na miejscowo zaawansowanego raka piersi i u większości chorych z nawrotowym, rozsiałym nowotworem<sup>(22,23)</sup>. Istnieje alternatywna hipoteza co do powstawania p95, według której krótkie fragmenty HER2 mogą powstawać dzięki wewnętrznym miejscom inicjacji translacji (*internal ribosome entry site*, IRES) znajdującym się w transkrypcie genu *HER2*<sup>(4,13,21,24)</sup>. Pojawiły się doniesienia, że p95 może tworzyć

Upon binding of a ligand, conformation of ECD changes, resulting in an “open conformation type” enabling binding thereof with another receptor of the family<sup>(13)</sup>. This may be the same type of receptor (a process termed “homodimerization”) or another member of the family (“heterodimerization”)<sup>(14,15)</sup>. As estimated, about 10 types of dimers may arise, but the highest potential for signal transmission is associated with heterodimers involving the HER2 receptor<sup>(15)</sup>. HER2 is the preferred dimerization partner for other members of the family, while the most effective in signal transmission is the HER2-HER3 complex<sup>(14)</sup>. The next step consists in activation of intracellular domains, in particular their components showing enzymatic activity of tyrosine kinase, facilitating cross-phosphorylation of c-end intracellular segments of receptor forming the dimer<sup>(4,6,10)</sup>. The latter step of receptor activation enables transmission of activation to intracellular signal proteins, which in turn pass the information to the nucleus, setting in motion transcription of genes regulating cellular life processes. Networks of HER-dependent intracellular signal transmission are presented in fig. 2. The final effect of HER receptor activation is cellular response consisting in activation of proliferation and migration, release of angiogenic factors and inhibition of apoptosis<sup>(16)</sup>.

To date, no specific ligand for HER2 receptor has been identified. According to some authors, its ECD domain remains continuously in “open” conformation, enabling dimerization<sup>(13,17)</sup>. In the case of HER2, dimerization may occur when the receptor becomes overexpressed in the cellular membrane<sup>(4,5)</sup> – at a certain critical density of receptors, the balance shifts from monomers towards dimers. Furthermore, in murine neuroblastoma and glioblastoma models, a mutation variant of HER2 receptor has been identified, featuring continuous tyrosine kinase activity. Mutation concerns the transmembrane domain, where at the position 6643 valine has been replaced by glutamic acid (Val-6643>Glu)<sup>(18,19)</sup>. According to one theory, HER2 may be also activated by ECD proteolysis, giving rise to a shorter variant of the receptor (p95) with a continuous enzymatic activity<sup>(20)</sup>. Name of this protein reflects the fact that after liberation of HER2 ECD with a molecular mass of 110 kDa, there is a 95 kDa segment left, including the transmembrane and intracellular domains<sup>(4,21)</sup>. The ECD domain is released to the extracellular fluid and then to the bloodstream, where it may be detected. Clinical experience indicates that serum ECD is present in only 6% of patients at early clinical stages of breast cancer, in about 25% of those with locally-advanced cancer, and in a majority of those with recurrent disseminated tumor<sup>(22,23)</sup>. There is an alternative hypothesis concerning formation of p95, whereby short fragments of HER2 may arise thanks to internal loci of initiation of translation (*internal ribosome entry sites*, IRES) within the transcript product of the *HER2* gene<sup>(4,13,21,24)</sup>. According to some reports, p95 may form homodimers and dimerize with HER3 receptors<sup>(25)</sup>. In murine models, it has oncogenic properties promoting rapid development of lung metastases<sup>(4,21,24)</sup>.

## PREDICTIVE ROLE OF HER2 RECEPTOR

On physiological grounds, HER receptors are involved in processes of differentiation, proliferation and migration of cells and control of apoptosis. They are crucial in organogenesis



**Użyte skróty:** Shc – adaptorowe białko homologiczne do Src i kolagenu (*Src homologous and collagen protein*); PI3K – kinaza 3-fosfatydiloizotolu (*phosphatidylinositol 3-kinase*); Akt – kinaza serynowo-treoninowa Akt; mTOR – kinaza mTOR (*mammalian target of rapamycin kinase*); Ras – GTP-aza białkowa Ras (*RAT sarcoma*); Raf – kinaza serynowo-treoninowa Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*); MEK 1/2 – kinaza kinaz białkowych aktywowanych miogienami (*dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2*); MAPK – kinaza białkowa aktywowana miogienami (*mitogen-activated protein kinase*); kinaza Src (*SaRComa*); Jak – kinaza Jak (*Janus kinase*); STAT – przekaźnik sygnałów i aktywator transkrypcji (*signal transducer and activator of transcription*); PLC $\gamma$  – fosfolipaza C $\gamma$  (*phospholipase C- $\gamma$* ); DAG – diacylglicerol (*diacylglycerol*); PKC – kinaza białkowa C (*protein kinase C*).

**Abbreviations used:** Shc – adaptor protein homologous to Src and collagen; PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase; Akt – serine-threonine kinase Akt; mTOR – mammalian target of rapamycin kinase; Ras – GTP-ase Ras (*RAT sarcoma*); Raf – serine-threonine kinase Raf (*rapidly accelerating fibrosarcoma*); MEK1/2 – dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2; MAPK – mitogen-activated protein kinase; Src kinase (*SaRComa*); Jak kinase (*Janus kinase*); STAT – signal transducer and activator of transcription; PLC $\gamma$  – phospholipase C $\gamma$ ; DAG – diacylglycerol; PKC – protein kinase C.

Rys. 2. Przekazywanie sygnału przez pobudzone receptory HER do wnętrza komórki. C-końcowe fragmenty receptorów HER po ufosforylowaniu stają się celem dla białek enzymatycznych zawierających motyw homologiczny dla białka SRC (SRC homologous domain) zwany domeną SH2, np. podjednostka p85 kinazy 3-fosfatydiloizotolu, białko Ras o aktywności GTP-azy, fosfolipaza C $\gamma$ . Istnieją także białka zawierające domenę SH2, ale niemające aktywności enzymatycznej, służące tylko jako białka adaptorowe i łączące receptory HER z innymi enzymami zaangażowanymi w przekazywanie sygnału. Pobudzony receptor HER2 wymaga pośrednictwa takiego właśnie białka adaptorowego do przeniesienia sygnału do wnętrza komórki. Tę rolę odgrywa GRB7 (growth factor receptor-bound protein 7). Białko GRB 7 zawiera domenę SH2, dzięki której odgrywa rolę łącznika między aktywnym receptorem błonowym a ścieżką sygnałową Ras>Raf>Mek>MAPK

Fig. 2. Signal transmission by activated HER receptors into the cell. Upon phosphorylation, C-terminal segments of HER receptors become targets for enzymatic proteins equipped with a motif homologous with the SRC protein, termed SH2 domain, e.g. subunit p85 of phosphatidylinositol 3-kinase, GTP-ase activity-exerting Ras protein, C $\gamma$  phospholipase. There are also proteins featuring an SH2 domain but devoid of enzymatic activity, serving as adapter proteins and binding HER receptors with other enzymes involved in signal transmission. Activated HER2 receptor requires the presence of such an adapter protein for signal transmission into the cell. This role is fulfilled by growth factor receptor-bound protein 7 (GRB7). The GRB7 protein possesses the SH2 domain, enabling it to play the role of a connector between activated membrane receptor and signal pathway Ras>Raf>Mek>MAPK

homodimery oraz ulegać dimeryzacji z receptorem HER3<sup>(25)</sup>. W modelach mysich ma on właściwości onkogenne i warunkuje szybkie wystąpienie przerzutów do płuc<sup>(4,21,24)</sup>.

## ROLA PROGNOSTYCZNA RECEPTORA HER2

Fizjologicznie receptory HER zaangażowane są w procesy różnicowania, podziałów i migracji komórek oraz kontroli apoptozy. Mają krytyczne znaczenie w organogenezie, a patologie związane z ich funkcjonowaniem mogą prowadzić do śmierci w okresie embrionalnym, chorób neurodegeneracyjnych czy karcynogenezy<sup>(26)</sup>.

Do nowotworzenia prowadzi prawdopodobnie stan, w którym występuje w komórce nadmierna ilość receptorów HER2 (nadekspresja), a sygnał od nich zależny jest wzmocniony. Nadekspresję receptora HER2 zaobserwowano w różnych nowotworach złośliwych, m.in. w raku żołądka<sup>(27)</sup>, raku jajnika<sup>(28)</sup> czy raku *endometrium*<sup>(29)</sup>. Najlepiej jednak poznano znaczenie tego zjawiska w raku piersi.

Według różnych badaczy nadekspresja receptora HER2 lub amplifikacja (zwiększenie liczby kopii) jego genu dotyczy 17-33% raków piersi<sup>(1,4,30-33)</sup>. Rozbieżność wyników jest wynikiem różnych metod badania, obecnie przyjmuje się, że u co czwartej chorej rozwój raka piersi zależy od nadmiernej aktywności receptora.

Nadekspresja receptora HER2 może wynikać z amplifikacji (zwiększenia liczby kopii) genu *HER2*, polisomii (>2) chromosomu 17,<sup>(34,35)</sup> albo z mechanizmów epigenetycznych regulujących transkrypcję genu lub zwiększających stabilność mRNA<sup>(36,37)</sup>. Jakkolwiek uważa się, że amplifikacja genu jest głównym powodem nadekspresji HER2<sup>(6,7)</sup>, to jednak analizy pierwotnych guzów piersi nie potwierdzają istnienia całkowitej zgodności amplifikacji genu z nadekspresją jego transkryptu czy produktu białkowego<sup>(37-39)</sup>. Niezależnie jednak od tego, czy oceniana jest ilość kopii genu czy też jego produkt białkowy, obecnie autorzy są zgodni, że guzy HER2-pozytywne charakteryzują się bardziej agresywnym rozwojem i gorszym rokowaniem<sup>(1,4,40-43)</sup>.

Obecność receptora w komórkach nowotworowych wiąże się ze skróconym czasem do nawrotu choroby po zabiegu operacyjnym oraz skróconym czasem przeżycia całkowitego<sup>(40,44-50)</sup>. Guzy HER2-pozytywne to najczęściej raki przewodowe<sup>(51)</sup>, rzadziej wykazują ekspresję receptorów hormonalnych<sup>(1,4,47)</sup>, a częściej – większy stopień złośliwości<sup>(38,49,51,52)</sup>. U chorych HER2-pozytywnych częściej w chwili rozpoznania stwierdzone jest zajęcie węzłów chłonnych<sup>(47)</sup>. Chore HER2-pozytywne z przerzutami do węzłów mają szczególnie złe rokowanie, według różnych autorów prawdopodobieństwo 3-letniego przeżycia bez nawrotu choroby wynosi u nich jedynie około 40%<sup>(32,33,53)</sup>.

Wydaje się, że nadekspresja receptora HER2 nie tylko warunkuje agresywny charakter nowotworów złośliwych piersi, ale także odgrywa istotną rolę w ich rozwoju począwszy od stadium przedinwazyjnego<sup>(54,55)</sup>. Wyjątkowo często, bo w 41-46% przypadków, obserwuje się nadekspresję HER2 w przewodowych rakach *in situ* (*ductal carcinoma in situ*, DCIS)<sup>(51,56-58)</sup>. Nadekspresja HER2 w tych guzach ma związek z mniejszym stopniem dojrzałości histologicznej<sup>(59,60)</sup>.

and their dysfunction may result in death of the embryo, neurodegenerative diseases and carcinogenesis<sup>(26)</sup>.

Carcinogenesis is probably a result of excessive density of HER2 receptors in the cell (overexpression), whereby signals transmitted by them become too strong. HER2 overexpression was seen in several malignant tumors, including stomach cancer<sup>(27)</sup>, ovarian cancer<sup>(28)</sup> or endometrial cancer<sup>(29)</sup>. Best understood is the role of this phenomenon in breast cancer.

In several authors' opinion, HER2 overexpression or amplification (multiplication of copies) of its encoding gene is present in 17-33% of breast cancer cases<sup>(1,4,30-33)</sup>. Discrepancy of results is due to varying methodology and according to current estimates, in one in four patients development of breast cancer depends on excessive activity of this receptor.

HER2 overexpression may be due to amplification (multiplication of copies) of *HER2*-encoding gene, polysomy (>2) of the chromosome 17<sup>(34,35)</sup> or to epigenetic mechanisms controlling gene transcription or increasing stability of mRNA<sup>(36,37)</sup>. Even if gene amplification is the main cause of HER2 overexpression<sup>(6,7)</sup>, analysis of primary breast tumors does not confirm entire concordance between gene amplification and overexpression of its transcript or protein product<sup>(37-39)</sup>. Whichever parameter is evaluated – number of gene copies or its protein product – most authors agree that HER2-positive tumors take a more aggressive clinical course and have a worse prognosis<sup>(1,4,40-43)</sup>.

Presence of this receptor in cancer cells correlates with shorter recurrence-free survival after surgical treatment and worse overall survival<sup>(40,44-50)</sup>. HER2-positive tumors are usually ductal cancers<sup>(51)</sup>, rarely showing expression of hormone receptors<sup>(1,4,47)</sup> and frequently – higher malignancy grade<sup>(38,49,51,52)</sup>. HER2-positive patients frequently have lymph node invasion at the time of diagnosis<sup>(47)</sup>. These patients have a particularly poor prognosis and their 3-year survival rate is only about 40% in several reports<sup>(32,33,53)</sup>.

It would appear that HER2 overexpression not only contributes to a more aggressive behavior of breast cancer, but also plays an important role in its development, starting already at the preinvasive stage<sup>(54,55)</sup>. Particularly frequent (41-46%) is HER2 overexpression in *in situ* ductal cancers (DCIS)<sup>(51,56-58)</sup>. In these tumors, HER2 overexpression correlates with greater histological immaturity<sup>(59,60)</sup>.

## QUALIFICATION FOR ANTI-HER2 TREATMENT

Prognosis in HER2-positive patients significantly improved after introduction of agents targeted specifically against this molecular target. In 1995 anti-HER2 monoclonal antibody has been first administered in patients with disseminated breast cancer<sup>(61)</sup> and, 3 years later, upon confirmation of effectiveness of the drug, American Food and Drug Administration (FDA) approved the use of trastuzumab in palliative treatment of breast cancer. In 2006, the preparation has also been approved for adjuvant treatment.

As anti-HER2 therapy is effective only in patients with receptor overexpression<sup>(62,63)</sup>, prior to qualification for this treatment

## KWALIFIKACJA DO LECZENIA ANTY-HER2

Rokowanie u chorych HER2-pozytywnych istotnie poprawiło się wraz z pojawieniem się leków ukierunkowanych na cel molekularny, jakim jest ten receptor. W 1995 roku zastosowano po raz pierwszy przeciwciała monoklonalne anty-HER2 u pacjentek z rozsiałym rakiem piersi<sup>(61)</sup>, a 3 lata później, po potwierdzeniu skuteczności leku, amerykańska FDA (Food and Drug Administration) zaaprobowała trastuzumab w leczeniu paliatywnym raka piersi. W 2006 roku preparat zarejestrowano także w leczeniu uzupełniającym.

Ponieważ leczenie anty-HER2 jest skuteczne tylko u chorych z nadekspresją receptora<sup>(62,63)</sup>, przed kwalifikacją do terapii należy określić stan jego ekspresji w komórkach nowotworowych<sup>(61,64)</sup>. Według różnych autorów w błonie komórek 17-21% guzów piersi występuje nadekspresja receptora HER2<sup>(48,49,51)</sup> oceniana metodą immunohistochemiczną w materiale tkankowym utrwalonym w parafinie. Amplifikacja genu *HER2* dotyczy 17-33% guzów piersi<sup>(38,65,66)</sup>, w tym 83-97% guzów z amplifikacją *HER2* wykazuje nadekspresję białka ocenianą metodą immunohistochemiczną<sup>(38,65,67)</sup>. Amplifikacja oceniana jest metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) lub chromogenicznej hybrydyzacji *in situ* (*chromogenic in situ hybridization*, CISH).

Według aktualnych wytycznych u każdej chorej z rakiem inwazyjnym piersi należy zweryfikować stan HER2 metodą immunohistochemiczną. W Polsce wykorzystywany jest w tym celu komercyjny zestaw odczynników, tzw. HercepTest (Dako), zawierający przeciwciała skierowane przeciw domenie wewnątrzkomórkowej HER2. Odczyn oceniany jest półilościowo wg specjalnych wytycznych przewidzianych dla testu w zakresie 0-3+. Guzy 0-1+ uznawane są za HER2-negatywne, a 3+ – za HER2-pozytywne. Odczyn 2+ wymaga weryfikacji metodą FISH. Algorytm diagnostyczny dla określenia stanu receptora HER2 w guzach piersi przedstawiono na rys. 3.

Jeżeli w komórkach nowotworowych występuje polisomia chromosomu 17. bez amplifikacji genu receptora, za potencjalnie wrażliwe na leczenie przeciwciałem uznaje się obecnie guzy z nadekspresją białka.

Aktualne wytyczne w tym zakresie są powtórzeniem zaleceń dla chorych kwalifikowanych do leczenia trastuzumabem. Pamiętać jednak należy, że taka kwalifikacja nie ma dodatkowej wartości predykcyjnej ani dla leczenia przeciwciałem, ani dla leków z grupy drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz. Oznacza to, że nadekspresja receptora lub amplifikacja genu nie identyfikuje chorych, które na leczenie odpowiedzą, a jedynie pozwala nie kwalifikować chorych, które z pewnością nie odniosą korzyści z terapii. Być może trwające badania translacyjne pozwolą zidentyfikować markery o takiej wartości.

## MECHANIZM DZIAŁANIA TRASTUZUMABU

Trastuzumab jest humanizowanym, tzn. zawierającym 95% białka ludzkiego, przeciwciałem monoklonalnym o strukturze charakterystycznej dla podklasy IgG1. Skierowany jest przeciw domenie zewnątrzkomórkowej receptora HER2, jego epitop

modality, status of expression in cancer cells must be determined<sup>(61,64)</sup>. In several authors' opinion, 17-21% of breast cancer cases show HER2 overexpression confirmed by immunohistochemical technique in paraffin-preserved tissue samples<sup>(48,49,51)</sup>. *HER2* gene amplification is present in 17-33% of breast cancer cases, whereby 83-97% of tumors showing overexpression of corresponding protein as assessed by immunohistochemical technique<sup>(38,65,67)</sup>. Amplification evaluated by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) or chromogenic *in situ* hybridization (CISH).

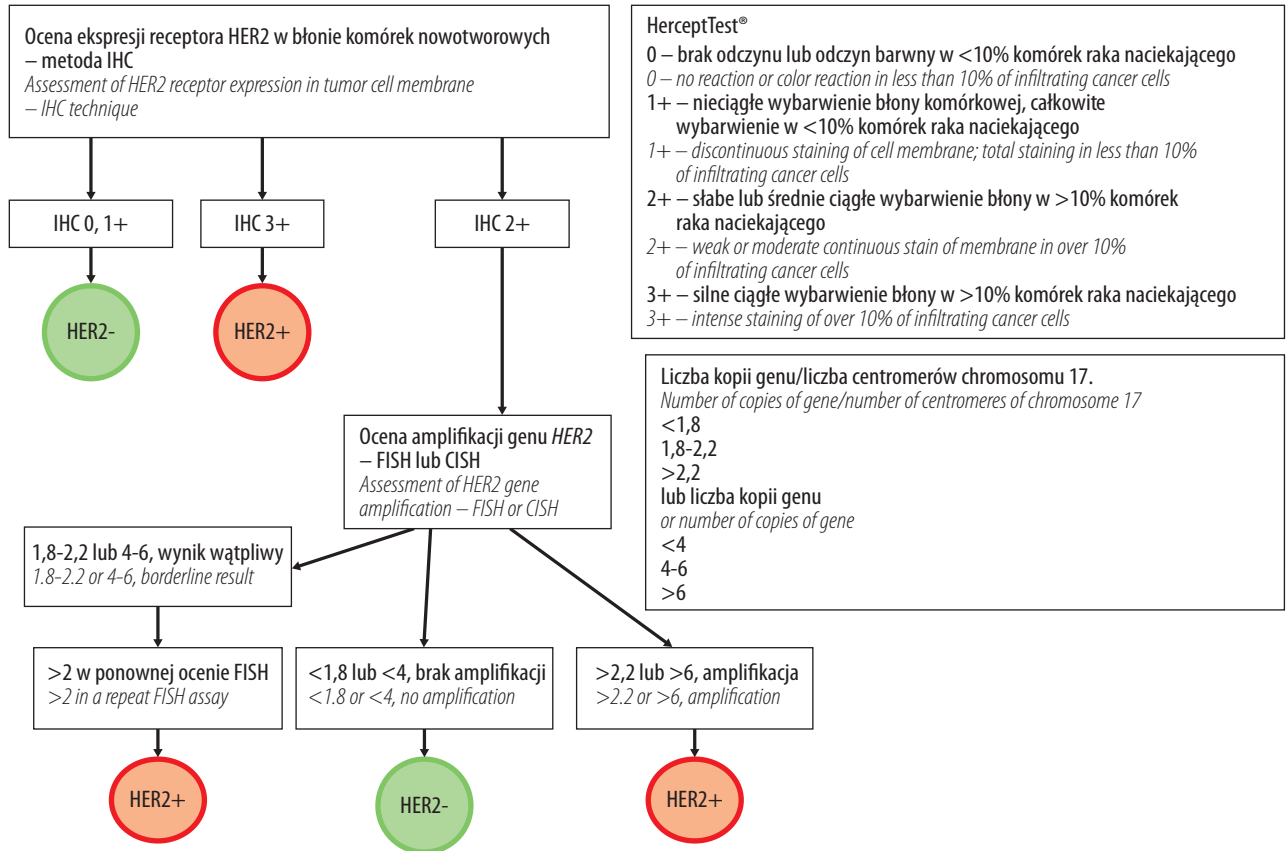
According to currently valid guidelines, each patient with invasive breast cancer should undergo HER2 status verification. In Poland, the commercially available kit HercepTest (Dako) is used to this purpose, containing antibodies directed against HER2 intracellular domain. The assay is evaluated semiquantitatively according to special guidelines developed for this test within 0 to 3+ range. Tumors scoring 0-1+ are considered HER2-negative and those scoring 3+ – as HER2-positive. The 2+ score necessitates verification by the FISH technique. Diagnostic algorithm for determination of HER2 receptor status in breast cancer patients is presented in fig. 3.

If tumor cells present chromosome 17 polysomy without receptor gene amplification, potential candidates for antibody treatment are considered tumors showing overexpression of protein.

Current guidelines in this area are the same as those for patients qualified for trastuzumab treatment. Noteworthy is that such qualification has no additional predictive value nor for antibody treatment as such, neither for drugs from the small-molecule kinase inhibitor family. Therefore, receptor overexpression or gene amplification does not allow identification of patients who will respond to treatment and only enables exclusion of patients who certainly will not benefit from the therapy. Hopefully, undergoing clinical translation trials will identify markers providing such an information.

## MECHANISM OF ACTION OF TRASTUZUMAB

Trastuzumab is a humanized (i.e. including over 95% human proteins) monoclonal antibody, structurally similar to the IgG1 subclass. It is directed against the extracellular domain of HER2, with epitope located near cellular membrane<sup>(7,14)</sup>. The antibody blocks HER2 activity. Used in monotherapy, it probably is unable to initiate apoptosis of cancer cells, while it does exert a cytostatic effect, arresting the cell cycle at the G1/S phase, increases activity of p27 protein and reduces activity of D1 cyclin and cyclin-dependent kinase CDK2<sup>(7)</sup>. Mechanism of action of the drug is a complex one with several mutually complementary theories explaining its therapeutic effect, schematically presented in fig. 4. Trastuzumab inhibits ECD proteolysis, while reduced EDC release may block formation of active shortened form of the receptor p95. The drug also inhibits activation of receptor and its dimerization partner, thereby blocking intracellular signal-transmitting pathways. Studies of tumors operated on after neoadjuvant systemic treatment using trastuzumab revealed its impact on signal pathways PI3K-AKT



Rys. 3. Algorytm oceny stanu receptora HER2 w komórkach raka piersi

Użyte skróty: IHC – badanie immunohistochemiczne; FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

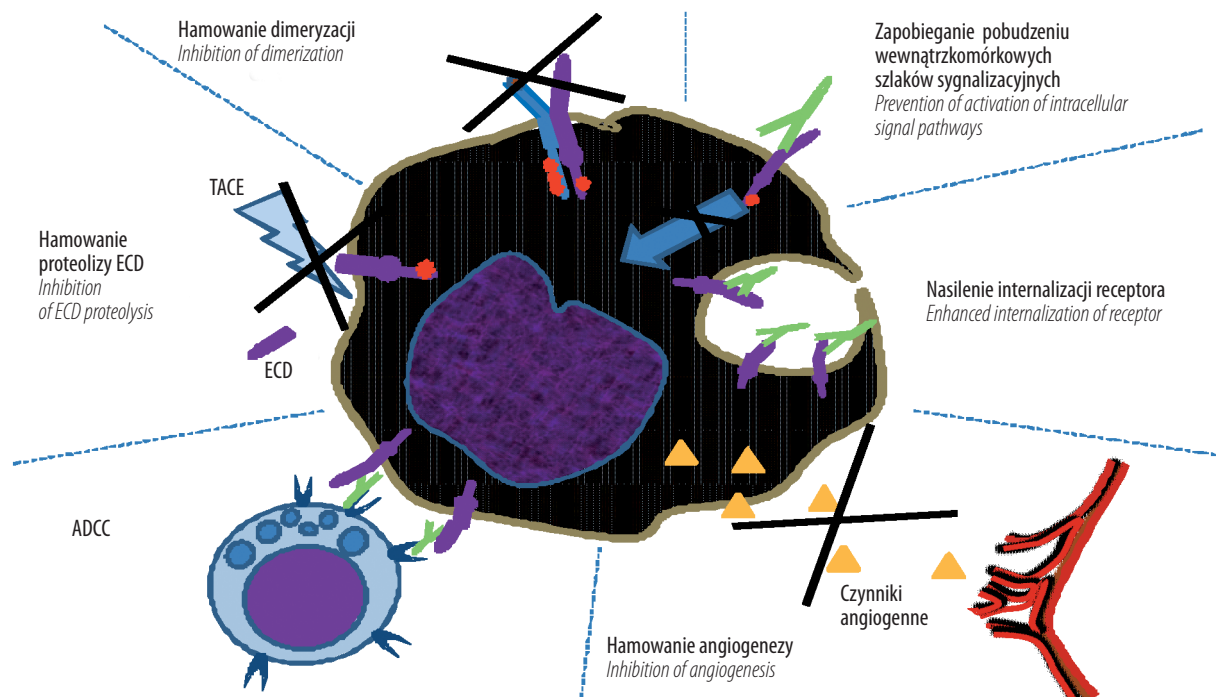
Fig. 3. Algorithm of assessment of HER2 receptor status in breast cancer

Abbreviations used: IHC – immunohistochemical study; FISH – fluorescence in situ hybridization

znajduje się w pobliżu błony komórkowej<sup>(7,14)</sup>. Przeciwciała hamuje aktywność receptora HER2. Stosowane w monoterapii prawdopodobnie nie ma zdolności uruchamiania apoptozy komórek nowotworowych, natomiast wywiera efekt cytostatyczny, hamując cykl komórkowy w fazie G1/S; powoduje zwiększenie aktywności białka p27 i zmniejszenie aktywności cykliny D1 oraz kinazy CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*)<sup>(7)</sup>. Mechanizm działania leku jest złożony, istnieje kilka wzajemnie uzupełniających się teorii tłumaczących jego aktywność, co schematycznie przedstawiono na rys. 4. Trastuzumab hamuje proteolizę domeny zewnątrzkomórkowej, a poprzez ograniczenie uwalniania ECD może blokować powstawanie aktywnej skróconej formy receptora – p95. Lek hamuje także aktywację receptora i jego partnera dimeryzacji, dzięki czemu blokuje wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnału. Badania guzów operowanych po neoadiuwantowym leczeniu systemowym z użyciem trastuzumabu wykazały jego wpływ na ścieżki przekaźnikowe PI3K-AKT i MAPK-Erk. Kolejny mechanizm działania przeciwciała to nasilenie internalizacji i degradacji receptora. Trastuzumab ma swój udział w hamowaniu angiogenezy, dzięki zablokowaniu sygnału płynącego od receptora HER2. Badania przedkliniczne wykazały negatywny wpływ immunoterapii na proces angiogenezy dzięki zahamowaniu ekspresji VEGF,

and MAPK-Erk. Another mechanism of action of the antibody is by enhanced internalization and degradation of the receptor. Trastuzumab participates in inhibition of angiogenesis, thereby blocking signals transmitted from the HER2 receptor. Preclinical trials revealed a negative impact of immune therapy on angiogenesis by inhibition of expression of VEGF, TGF- $\alpha$ , PAI1 and angiopoietin 1, as well as by promoting expression of antiangiogenic factors, e.g. thrombospondin 1. An important component of drug activity is activation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The Fc segment of trastuzumab is recognized by Fc $\gamma$  receptor of NK cells. If the antibody is bound to a cancer cell, this phenomenon initiates a NK attack by the ADCC mechanism. Studies of tumors excised after neoadjuvant treatment by docetaxel and trastuzumab revealed infiltration of NK cells within the tumor and enhanced activity of lymphocytes as compared with controls. Furthermore, genotype of Fc $\gamma$  receptors may affect the effectiveness of trastuzumab therapy. Better treatment outcomes in the field of ORR were obtained in patients with the genotype Fc $\gamma$  R IIIa-158 Val/Val genotype. Also, when combined with radiotherapy and chemotherapy, trastuzumab may inhibit DNA repair mechanisms by reducing expression of p21 protein responsible for cellular response to damaged DNA<sup>(7,67,68)</sup>.





Rys. 4. Mechanizmy działania trastuzumabu  
Fig. 4. Mechanism of action of trastuzumab

TGF- $\alpha$ , PAI1 i angiopoetyny 1 oraz pobudzeniu ekspresji czynników antyangiogennych, np. trombospondyny 1. Ważnym elementem działania leku jest uruchamianie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Fragment Fc trastuzumabu jest rozpoznawany przez receptor Fc $\gamma$  komórek NK. Jeżeli przeciwciało związane jest z komórką nowotworową, zjawisko to inicjuje atak komórek NK w mechanizmie ADCC. Badania guzów usuniętych po neoadiuwantowym leczeniu docetakselem i trastuzumabem wykazały nacieki komórek NK w tkance guzów oraz zwiększoną aktywność limfocytów w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano także, że genotyp receptorów Fc $\gamma$  może mieć wpływ na efektywność terapii trastuzumabem. Lepsze wyniki leczenia w zakresie ORR uzyskano u pacjentek z genotypem Fc $\gamma$  R IIIa-158 Val/Val. Wreszcie w skojarzeniu z radioterapią i chemioterapią trastuzumab hamuje procesy naprawcze DNA, gdyż zmniejsza ekspresję białka p21 odpowiedzialnego za komórkową odpowiedź na uszkodzenie DNA<sup>(7,67,68)</sup>.

## PODSUMOWANIE

Identyfikacja receptora HER2 oraz poznanie znaczenia jego nadekspresji w komórkach raka piersi pozwoliły na wyróżnienie podgrupy chorych o agresywnym przebiegu choroby oraz ze złą prognozą. Z drugiej strony poznanie budowy i funkcji receptora zapoczątkowało prace nad lekami ukierunkowanymi na ten cel molekularny. Ich wprowadzenie do praktyki klinicznej poprawiło prognozę u chorych HER2-pozytywnych. Pierwszy z tych leków to przeciwciało monoklonalne trastuzumab,

## SUMMATION

Identification of the HER2 receptor and elucidation of role of its overexpression in the breast cancer cells enabled identification of patients at risk of a more aggressive clinical course of the disease and poor prognosis. On the other hand, better understanding of structure and function of this receptor initiated studies of drugs directed against this particular molecular target. Their introduction to clinical practice improved prognosis in HER2-positive patients. The first of this class of drugs, i.e. monoclonal antibody trastuzumab, is used in both adjuvant and palliative treatment, while the second – small-molecule tyrosine kinase inhibitor lapatinib – is used in the treatment of disseminated and recurrent breast cancer after failure of trastuzumab therapy. Currently intensive studies are underway aiming at optimizing the use existing drugs and development of novel agents targeted against the HER2 receptor.

## PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Frogne T, Laenkholm A.V, Lyng M.B i wsp.: Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: R11.
2. Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F i wsp.: The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14: 320-368.

mające zastosowanie zarówno w leczeniu uzupełniającym, jak i paliatywnym, drugi to drobnocząsteczkowy inhibitor kinaz tyrozynowych, lapatinib, wykorzystywany w leczeniu rozsia-  
nego/nawrotowego raka piersi po niepowodzeniu terapii trastuzumabem. Obecnie toczą się intensywne badania nad rozszerzonym zastosowaniem istniejących już leków oraz iden-  
tyfikacją nowych substancji leczniczych ukierunkowanych na receptor HER2.

3. Schechter A.L., Stern D.F., Vaidyanathan L. i wsp.: The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312: 513-516.
4. Scaltriti M., Rojo F., Ocaña A. i wsp.: Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 628-638.
5. Brennan P.J., Kumagai T., Berezov A. i wsp.: HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* 2000; 19: 6093-6101.
6. Koutras A.K., Evans T.R.: The epidermal growth factor receptor family in breast cancer. *Onco. Targets Ther.* 2008; 1: 5-19.
7. Mukohara T.: Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci.* 2011; 102: 1-8.
8. Riese D.J., Kim E.D., Elenius K. i wsp.: The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor- $\alpha$ , heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 20047-20052.
9. Knowlden J.M., Gee J.M., Seery L.T. i wsp.: C-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* 1998; 17: 1949-1957.
10. Culouscou J.M., Carlton G.W., Aruffo A.: HER4 receptor activation and phosphorylation of Shc proteins by recombinant heregulin-Fc fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 12857-12863.
11. Li X., Pérez L., Pan Z., Fan H.: The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res.* 2007; 17: 985-998.
12. Sunnarborg S.W., Hinkle C.L., Stevenson M. i wsp.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 12838-12845.
13. Pedersen K., Angelini P.D., Laos S. i wsp.: A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol. Cell Biol.* 2009; 29: 3319-3331.
14. Spector N.L., Blackwell K.L.: Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5838-5847.
15. Lenferink A.E., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M.L. i wsp.: Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 1998; 17: 3385-3397.
16. Burden S., Yarden Y.: Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997; 18: 847-855.
17. Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X. i wsp.: Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421: 756-760.
18. Fleishman S.J., Schlessinger J., Ben-Tal N.: A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 15937-15940.
19. Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A.: Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 1986; 45: 649-657.
20. Segatto O., King C.R., Pierce J.H. i wsp.: Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol. Cell. Biol.* 1988; 8: 5570-5574.
21. Arribas J., Parra-Palau J.L., Pedersen K.: HER2 fragmentation and breast cancer stratification. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 4071-4073.
22. Christianson T.A., Doherty J.K., Lin Y.J. i wsp.: NH2-terminally truncated Her-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 5123-5129.
23. Singer C.F., Köstler W.J., Hudelist G.: Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1786: 105-113.
24. Anido J., Scaltriti M., Bech Serra J.J. i wsp.: Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J.* 2006; 25: 3234-3244.
25. Sáez R., Molina M.A., Ramsey E.E. i wsp.: p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 424-431.
26. Adamson E.D.: Oncogenes in development. *Development* 1987; 99: 449-471.
27. Lemoine N.R., Jain S., Silvestre F. i wsp.: Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br. J. Cancer* 1991; 64: 79-83.
28. van Dam P.A., Vergote I.B., Lowe D.G. i wsp.: Expression of c-erbB-2, c-myc, and c-ras oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 914-919.
29. Grushko T.A., Filiaci V.L., Mundt A.J. i wsp.: An exploratory analysis of HER-2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *Gynecol. Oncol.* 2008; 108: 3-9.
30. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A. i wsp.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
31. Tiwari R.K., Borgen P.I., Wong G.Y. i wsp.: HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res.* 1992; 12: 419-425.
32. Borg A., Tandon A.K., Sigurdsson H. i wsp.: HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990; 50: 4332-4337.
33. Tandon A.K., Clark G.M., Chamness G.C. i wsp.: HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1989; 7: 1120-1128.
34. Bacus S.S., Ruby S.G., Weinberg D.S. i wsp.: HER-2/neu oncogene expression and proliferation in breast cancers. *Am. J. Pathol.* 1990; 137: 103-111.
35. Hofmann M., Stoss O., Gaiser T. i wsp.: Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J. Clin. Pathol.* 2008; 61: 89-94.
36. Kraus M.H., Popescu N.C., Amsbaugh S.C., King C.R.: Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J.* 1987; 6: 605-610.
37. Parkes H.C., Lillycrop K., Howell A., Craig R.K.: C-erbB2 mRNA expression in human breast tumours: comparison

- with c-erbB2 DNA amplification and correlation with prognosis. *Br. J. Cancer* 1990; 61: 39-45.
38. Berger M.S., Locher G.W., Saurer S. i wsp.: Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* 1988; 48: 1238-1243.
  39. Ellis C.M., Dyson M.J., Stephenson T.J., Maltby E.L.: HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J. Clin. Pathol.* 2005; 58: 710-714.
  40. Paterson M.C., Dietrich K.D., Danyluk J. i wsp.: Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 556-567.
  41. Sassen A., Rochon J., Wild P. i wsp.: Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R2.
  42. Pawlowski V., Révillion F., Hebbar M. i wsp.: Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 4217-4225.
  43. Lee Y., Cho S., Seo J.H. i wsp.: Correlated expression of erbB-3 with hormone receptor expression and favorable clinical outcome in invasive ductal carcinomas of the breast. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128: 1041-1049.
  44. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. i wsp.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
  45. Gasparini G., Gullick W.J., Bevilacqua P. i wsp.: Human breast cancer: prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy, and conventional pathologic features. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10: 686-695.
  46. Voduc K.D., Cheang M.C., Tyldesley S. i wsp.: Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1684-1691.
  47. Andrulis I.L., Bull S.B., Blackstein M.E. i wsp.: Neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. *Toronto Breast Cancer Study Group. J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 1340-1349.
  48. Potemski P., Pluciennik E., Bednarek A.K. i wsp.: A comparative assessment of HER2 status in operable breast cancer by real-time RT-PCR and by immunohistochemistry. *Med. Sci. Monit.* 2006; 12: MT57-MT61.
  49. McCann A.H., Dervan P.A., O'Regan M. i wsp.: Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 3296-3303.
  50. Ainsworth R., Bartlett J.M., Going J.J. i wsp.: IHC for HER2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of HER2 gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 2005; 58: 1086-1090.
  51. Somerville J.E., Clarke L.A., Biggart J.D.: c-erbB-2 overexpression and histological type of in situ and invasive breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 16-20.
  52. Paik S., Hazan R., Fisher E.R. i wsp.: Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1990; 8: 103-112.
  53. Carr J.A., Havstad S., Zarbo R.J. i wsp.: The association of HER-2/neu amplification with breast cancer recurrence. *Arch. Sur.* 2000; 135: 1469-1474.
  54. Leong A.S., Sormunen R.T., Vinyuvat S. i wsp.: Biologic markers in ductal carcinoma in situ and concurrent infiltrating carcinoma. A comparison of eight contemporary grading systems. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001; 115: 709-718.
  55. Siegel P.M., Ryan E.D., Cardiff R.D., Muller W.J.: Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J.* 1999; 18: 2149-2164.
  56. Meijnen P., Peterse J.L., Antonini N. i wsp.: Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br. J. Cancer* 2008; 98: 137-142.
  57. Leal C.B., Schmitt F.C., Bento M.J. i wsp.: Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995; 75: 2123-2131.
  58. Quinn C.M., Ostrowski J.L., Harkins L. i wsp.: Loss of bcl-2 expression in ductal carcinoma in situ of the breast relates to poor histological differentiation and to expression of p53 and c-erbB-2 proteins. *Histopathology* 1998; 33: 531-536.
  59. Mack L., Kerkvliet N., Doig G., O'Malley F.P.: Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erb B2, bcl-2, and ki-67. *Hum. Pathol.* 1997; 28: 974-979.
  60. Freudenberg J.A., Wang Q., Katsumata M. i wsp.: The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Exp. Mol. Pathol.* 2009; 87: 1-11.
  61. Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J. i wsp.: Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185 HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 737-744.
  62. Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D.: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 719-726.
  63. Johnston S., Pippin J. Jr, Pivot X. i wsp.: Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5538-5546.
  64. Treish I., Schwartz R., Lindley C.: Pharmacology and therapeutic use of trastuzumab in breast cancer. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 2000; 57: 2063-2076.
  65. Zhao J., Wu R., Au A. i wsp.: Determination of HER2 gene amplification by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 2002; 15: 657-665.
  66. Arnould L., Denoux Y., MacGrogan G. i wsp.: Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br. J. Cancer* 2003; 88: 1587-1591.
  67. Valabrega G., Montemurro F., Aglietta M.: Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol.* 2007; 18: 977-984.
  68. Molina M.A., Codony-Servat J., Albanell J. i wsp.: Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-HER2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 4744-4749.