

HER2-expresszió emlőrákban

Tóth József¹, Szentkúti András²

Országos Onkológiai Intézet, Budapest,¹ Roche (Magyarország) Kft., Budapest²

Emlőrákban a HER2 protoonkogen által kódolt HER2 receptor protein membrán-expressziója egyre nagyobb gyakorlati jelentőségű. Szövettenyészetekben és állatkísérletekben bebizonyosodott, hogy a HER2 gén amplifikációja daganatos transzformációt indukál, tumorsejtekben pedig a tumor agresszivitását növeli. A HER2-overexpresszió emlőrákokban rossz prognózist jelent, és összefügg az ún. fenó- és genotípusos prognosztikai markerekkel, és az áttétképződéssel. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az ún. rákmegelőző proliferációk és in situ „carcinomák” egy részében HER2 membránfestődés van. Ezekben az esetekben gyakran DNS aneuploidia, p53 mutációs protein és CD44v6 glycoprotein pozitívitas is tapasztalható. Véleményünk szerint ezekben az esetekben valódi carcinomás átalakulás valószínűsíthető.

Az invazív carcinomákban a HER2 protein immunhisztokémiai vizsgálatával, az irodalmi adatokkal egyezően, összefüggést találtunk az in situ és invazív carcinomák differenciáltsága és szövettani típusa, valamint agresszivitása, biológiai viselkedése között.

A HER2 receptor protein extracelluláris domainjéhez kötődő humanizált monoklonális antitest, a trastuzumab a klinikai vizsgálatokban hatékonynak bizonyult a HER2-t overexpresszáló metasztatikus emlőrákokban, mind monoterápia formájában, mind kemoterápiás szerekkel kombinálva. A DAKO „HercepTest” szemikvantitatív standardizált lehetőséget biztosít a HER2-overexpresszió kimutatására. *Magyar Onkológia 44:39–51, 2000.*

In breast cancer the membrane expression of HER2 receptor protein encoded by the HER2 proto-oncogene seems to have an ever growing clinical significance. In tissue cultures and animal experiments it was shown that the HER2 gene amplification induces malignant transformation and intensifies the aggressiveness of the tumour cells. Correlating with the so called pheno- and genotypic prognostic markers, the overexpression of HER2 in breast cancer predicts also poor prognosis and indicates enhanced potential for metastatisation.

In some of the so called precancerous proliferations and „in situ” carcinomas we demonstrated the enhanced membrane staining of the HER2 receptor protein. In these cases we frequently observed DNA aneuploidy, the presence of p53 mutational protein and CD44v6 glycoprotein. The immunohistochemical studies of HER2 protein in invasive carcinomas have revealed, an interrelationship between the grade of differentiation, histological type, aggressiveness and biological behaviour of the „in situ” and invasive carcinomas. In clinical studies trastuzumab, a humanized monoclonal antibody recognizing extracellular domain of HER2 receptor protein, has proved to be effective in HER2 overexpressing metastatic breast cancer either as monotherapy or in combination with chemotherapeutical agents. The DAKO „HercepTest” is a semiquantitative, standardised method for the determination of HER2 overexpression. *Tóth J, Szentkúti A. Expression of HER2 in breast cancer. Hungarian Oncology 44:39–51, 2000.*



Közlésre érkezett: 2000. január 5.
Elfogadva: 2000. január 31.

Levelezési cím: Prof. Dr. Tóth József, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9.
Tel.: 224-8784, Fax: 224-8620, E-mail: joto@oncol.hu

Bevezetés

A HER2 protoonkogén emlőrákban és más tumortípusokban transzmembrán tirozinkináz növekedési faktor receptort kódoló protoonkogén, amelynek overexpressziója laboratóriumi körülmények között daganatos átalakulást, és a daganatsejtek agresszívabb biológiai viselkedését eredményezi, ami klinikailag különösen emlőrák eseteiben rossz prognózissal társul (2, 4, 11, 57, 68, 74, 124, 125).

A legújabb vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a HER2 a kemo- és hormonterápiára adott válasz egyik prediktív tényezője. A HER2-pozitivitás hormonkezelés hatástalansága mellett, az anthracyclin kemoterápiával szembeni fokozott érzékenységet jelent (19, 91, 98, 114). Az eredmények azonban nem egyértelműek. Logikus felismerés volt, hogy mivel a HER2-overexpresszió szerepet játszik a daganatos átalakulásban és az agresszívabb klinikai viselkedésben, specifikus daganatellenes kezelés ígértes célmolekulája lehet (2, 17, 20, 40, 64, 107). A HER2 receptor extracelluláris domainja ellen monoklonális antitesteket, tirozinkináz-gátló szereket, antiszenz módszereket és vakcinákat preparáltak (11, 12, 91, 98, 109, 148). A monoklonális antitestek magukban vagy más kemoterapeutikumokkal együtt adagolva, HER2-pozitív tumorokban hatékonyan bizonyultak (102, 104, 105, 117, 118, 119), sőt a radioszenzitivitást is fokozták (110).

Jelen munkánkban áttekintést szeretnénk adni a hatásmechanizmus területein nyert legfontosabb vizsgálati eredményekről. Ismertetjük a rák megelőző állapotok és az emlőrákok fenotípusos jellegzetességei valamint a morfológiai prognosztikai faktorok és a HER2-overexpresszió közötti összefüggéseket. A „HercepTest” (DAKO) bemutatásával célunk a HER2-státusz standardizált meghatározásának leírása. A HER2-státusz nem standardizált megítélése ellentmondó eredményeket szolgáltatott, ami kedvezőtlenül befolyásolta a kezelést is (113).

Megbeszélés, áttekintés, tárgyalás

Az erbB tirozinkináz-család emlőrákban azt a növekedési faktor-receptor rendszert alkotja, amely a tumorproliferáció autokrin vagy parakrin stimulálását végzi. Ez a receptorcsalád négy homológ receptort foglal magába: az epidermális növekedési faktor (EGF) receptorát - ami azonos az erbB1 (HER1-gyel), az erbB2 (HER2/neu), az erbB3 (HER3) és az erbB4 (HER4) receptort. A receptorok extracelluláris (kapcsoló), transzmembrán lipofil szegmentumból és intracelluláris szabályozó karboxil-terminális szegmentummal rendelkező protein tirozinkináz domainból épülnek fel (1, 2, 11, 93).

Az erbB receptorcsalád szerepet játszik a normális emlőmirigy kifejlődésében is. Az EGF-szerű ligandok mint a neuregulin stimulálják az emlőmirigy lobulo-alveoláris fejlődését. Az erbB1 károsodása hibás glanduláris fejlődést eredményez. Az egér emlőmirigy kialakulásának külön-

böző stádiumaiban a négy erbB receptor és ligandjaik eltérően expresszálódnak, a proteinek speciális szerepét jelezve (2, 11, 133).

Az emberi EGFR-2 (HER2) gén a 17-es kromoszóma q (hosszú karjának) 21-es szegmentumában található (25, 112). A HER2 gén 185 kD-s transzmembrán glikoproteint kódol, amit p185^{HER2}-vel jelölnek, gyakran egyszerűen HER2 proteinnek vagy receptornak hívják (11, 26, 87).

A peptid növekedési faktorok receptoraihoz történő kapcsolódása rendszerint dimerizációhoz vagy még nagyobb komplex képződéséhez társul. A rendszerint monomer formában lévő HER receptorok aktív receptordimereket alkotnak, amelyek ligandkötődéssel stabilizálódnak. Azonos receptorok dimerizációjával homodimerek jönnek létre, különböző HER monomerek heterodimereket alkotnak. A négy különféle receptor (HER1,2,3,4) összesen tíz különféle dimerkombinációt hozhatnak létre. Az emlőmirigy normális biológiájában a HER1-1, HER1-3, HER1-4, HER4-4 és HER3-4 homo- és heterodimerek játszanak szerepet. A malignus átalakulásban a HER2 monomerrel alkotott kombinációknak (HER2-3, HER2-1 és a HER2-4) van a legfontosabb szerepe (13, 14, 147). Az EGF-szerű ligandok csoportjába tartozik az EGF, a TGF-alfa és az amphiregulin, ezek csak az erbB1-gyel tudnak nagy affinitással kapcsolódni. A heregulinokat neu differenciációs faktornak (NDF-nek) vagy neuregulinak is nevezik. A heregulin mind az erbB3-mal, mind az erbB4-gyel kötődik, ezzel szemben a heparinkötő EGF (HB-EGF), az epiregulin és betacellulin kölcsönhatásba léphet az erbB1-gyel, erbB3-mal és erbB4-gyel is. Az erbB1-et ezért EGF-receptornak, az erbB3-at és 4-et heregulin-receptornak is nevezik (93).

Az HER2 „árva-egyedülálló” - orphan receptor saját külön ligand nélkül, ezért a jelátvitelben csak úgy tud résztvenni, ha a HER család más tagjaival hetero-asszociációba lép. Leghatásosabb a HER3-mal alkotott heterodimer. A HER3-nak hiányzik az intrinszc tirozinkináz-aktivitása, a két komponens (HER2/HER3) dimert alkotva egymás hiányosságát kiegészítik, funkcionális jelátviteli rendszert képeznek (93, 126). A HER2-2 és HER3-3 homodimerek viszont hatástalanok, mivel vagy ligandjuk (HER2-2), vagy tirozinkináz-aktivitásuk (HER3-3) hiányzik.

Mind az erbB2, mind az erbB3 citoplazmatikus része az erbB tirozinkináz aktiválódásakor foszforilálódik (50, 93).

Bebizonyították, hogy a heregulin-receptorok (erbB3 és 4) részt tudnak venni az EGF-indukált jelátvitelben. Az erbB1-et és 3-at expresszáló sejtvonalban az erbB3 tirozinfoszforilálását az EGF stimulálja (93). A sejtfelszíni HER2 proteint tartalmazó heterodimer receptorkomplexhez történő ligandkötődés a belső tirozinkináz-aktivitás elindításához vezet és tirozin-autofoszforilációt indukál. Ez egy olyan jelenségsorozatot jelöl, amelynek az az eredménye, hogy a sejtmembránon keresztül, valamint a citoplazmán át a maghoz történő jelátvitel génaktivációt vált ki, ami mitogén stimulációhoz vezet (14, 49, 115). Az új expressziót a „má-

sodlagos receptordimerizáció" jelzi, az elsődleges receptordimer ligand-indukált kialakulását követően a receptorok aktiválódnak és egymástól elkülönülve másik receptorhoz kapcsolódhatnak és más erbB proteinek aktiválhatják (48).

A HER2 szerepe a daganatos transzformációban

Szövettenyészetekben és állatkísérletekben bizonyosodott, hogy a HER2-overexpresszió tumorigenezist és malignus transzformációt okoz. Kimutatták, hogy a mutáns patkány NEU gén, amelyik azonos a HER2-vel, transzgén egér emlőmirigyében áttétképző emlőrák kialakulását indukálta. HER2 gén emberi emlő és ovarium tumorsejtvonalakba transzfektálva agresszívebb növekedési jellegzetességeket, fokozott DNS-szintézist, tumorigenitást és áttétképző hajlamot indukált „nude” egerekben (15, 21, 35, 55, 142).

HER2-amplifikáció/overexpresszió emlőrákban

HER2-amplifikáció és -overexpresszió számos emberi rákféleségben előfordul. Az ellentmondó adatok ellenére a génamplifikáció rendszerint alacsonyabb százaléokban fordul elő, mint az overexpresszió: ha a génamplifikáció és a fehérje receptor overexpresszió együttesen van jelen, kézenfekvő, hogy a tumor kialakulásában és progressziójában ezekben az esetekben alapvető szerepet játszik a HER2 onkogén. Ha egy tumorban csak a HER2-proteinszint emelkedett génamplifikáció nélkül, kérdéses, hogy ez a receptorfehérje milyen szerepet játszik a tumorok progressziójában. Itt merül fel az a fontos kérdés, hogy a HER2 receptor-fehérjét milyen módszerrel mutassuk ki, és az eredmények standardizálása hogyan történjen (11, 113).

A HER2-amplifikáció/overexpresszió premalignus nem invazív elváltozásokban, mint az emlő in situ ductalis carcinomájában (DCIS) is kimutatható. A HER2 gén amplifikációja az emlőrákok 15–30%-ában, a HER2 receptorprotein overexpressziója ennél valamivel magasabb arányban mutatható ki. Az amplifikáció azt jelenti, hogy a normális 2 génkópia helyett több, vagy legalább 5 génkópia alakul ki sejtenként. Általában 10 génkópia felett beszélünk amplifikált állapotról (84, 122, 125, 133). A HER2 gén amplifikációja fokozott géntíródáshoz vezet, amely magasabb HER2 mRNS-szintet eredményez. Ez egyidejűleg fokozott HER2 proteinszintézishez vezet, amely a sejtfelszínen overexpresszálódik. Az emlőráksejtek felszínén 10-100-szor magasabb a HER2 protein szintje mint a normális sejtek membránján. Megállapították, hogy a HER2 protein overexpresszióját az emlőcarcinomák 92%-ában génamplifikáció előzi meg (11, 29, 42, 88, 89, 97, 103).

A HER2 az emlőrákok esetében prognosztikai és prediktív tényező

Az emlőrák kórlefolását számos morfológiai-fenotípusos és nem morfológiai tényező befolyásolja.

A legfontosabb fenotípusos prognosztikátnak a tumor szövettani típusa, mérete, differenciáltsága, a nyirokcsomó státusz, a vascularis invázió, stb. számít. A nem morfológiai faktorok közé sorolható az ösztrogén- és progeszteronreceptor-tartalom, a proliferációs index, S fázisban lévő sejtek aránya, a DNS-ploidia, növekedési faktorok, onkogének (myc, ras), tumorszuppresszor gének (p53 stb.), proteázok (Cathepsin D), a sejtciklust szabályozók (cyclinek, cyclin dependens kinázok), a plazminogén rendszer (plazminogén-aktivitást gátlók stb.) (26, 34). Ezek közül a legáltalánosabban elfogadott tényező a szövettani (grade) differenciáltság, a nyirokcsomó, és a hormonreceptor-státusz (3, 6, 7, 11, 63, 86, 90, 99, 101, 111, 118, 123, 128, 138).

Számos klinikai vizsgálat, uni- és multivariációs analízis bebizonyította, hogy a HER2-pozitivitás rossz prognózissal társul. Statisztikailag szignifikáns összefüggést állapítottak meg a regionális nyirokcsomók pozitivitása és a primer tumor pozitív HER2 státusza között (31, 33, 45, 52, 58, 61, 134, 135). A korai, nyirokcsomó-negatív esetek vizsgálata ellentmondásos eredményeket szolgáltatott, mert a kutatók eltérő vizsgálati módszerekkel és standardokkal dolgoztak (16, 92, 120). A HER2-expresszió hatással van a daganatsejtek motilitására, a sejtheadhézióra és a drug rezisztenciára (143). Kísérleti körülmények között a HER2 integrinokkal társulva fokozza a tumorsejtek motilitását és invazivitását, valamint összefügg a tumorsejtek fokozott proliferációs aktivitásával és motilitásával (78, 106). Az HER2-overexpresszió csökkenti az E-cadherin gén átíródását, ezáltal a sejtheadhéziót is. Érdekes megfigyelés volt, hogy a HER2-overexpresszió a vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF) termelődését is fokozza (93, 121).

Férfi emlőrákban nem találtak a HER2-expresszió és a tumor biológiai viselkedése között összefüggést (16). A legújabb eredmények arra utalnak, hogy a HER2 proteint a normális sejtek-nél is alacsonyabb szinten vagy egyáltalán nem expresszáló (nincs HER2 gén) emlőcarcinomák vannak, amelyek az overexpressziót mutató esetekhez hasonlóan rossz prognózissal ösztrogén- és progeszteronreceptor-negatív tumorok (23, 96). Fentiek alapján az ösztrogén- és progeszteronreceptor rutinszerű meghatározása mellett helyesnek látszik a HER2-státusz meghatározását is elvégezni, annak prediktív és prognosztikai jelentősége miatt. Emellett a HER2 státusz ismerete nem csak a dignitás megítélésékor, hanem a terápia megválasztásában is fontos további információt jelent.

Saját vizsgálatok

A HER2 receptorprotein expressziójának összefüggése az in situ és invazív emlőrákok fenotípusos jellegzetességeivel

A HER2 gén amplifikációja és a HER2 receptorprotein overexpressziója szerepet játszik a daganatos átalakulásban az emlőrákok progressziójá-

1. táblázat: HER2 proteín expressziója rákmegelőző proliferációkban és in situ „carcinomákban”

Elváltozás	Esetszám	HER2	
		Pozitív	Negatív
ALH*	10	4	6
LCIS*	15	10	5
ADH*	10	6	4
DCIS*	10	10	–
IP*	10	8	2

A pozitív esetekben a parenchymasejtek több mint 10%-ában a sejtfelszín egyes membránszakaszai festődtek.

* ALH = atípusos lobularis hyperplasia; LCIS = lobularis in situ carcinoma; ADH = atípusos ductalis hyperplasia; DCIS = in situ ductalis carcinoma; IP = „atípusos” intraductalis papilloma

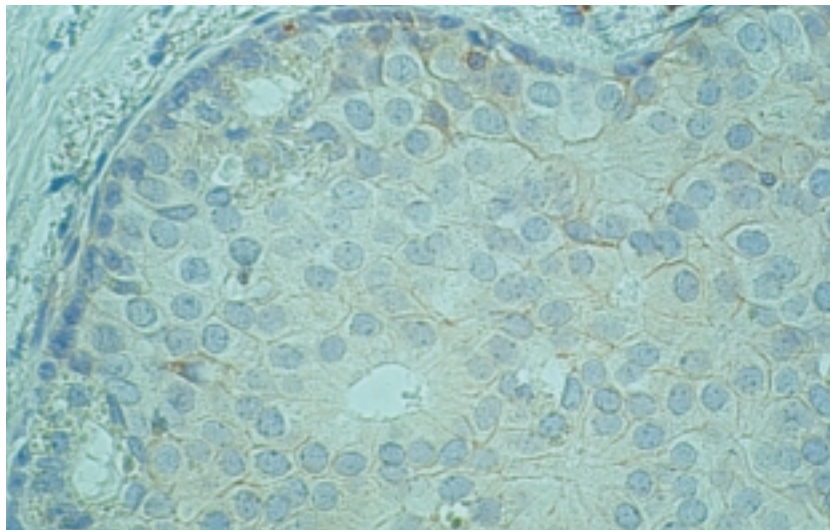
A lobularis carcinomák ún. B típusa, a nagysejtes variáns, mutatott csak HER2-pozitivitást.

2. táblázat: A Van Nuys osztályozás alapján csoportosított DCIS esetek HER2-overexpressziója

Szövettani típus	Esetszám	HER2	
		Pozitív esetek (%)	Negatív esetek (%)
Dedifferenciált comedo nekrozissal	21	18 (85,7)	3 (14,3)
Nem „high grade” nekrozissal	33	21 (63,6)	12 (36,4)
Nem „high grade” nekrozis nélkül	29	8 (27,6)	21 (72,4)

Van Nuys klasszifikáció (Silverstein et al. 1995)

1. ábra: Magasan differenciált cribriform DCIS. A parenchymasejtek kb. 10%-ának felszínén gyenge, egyes membránszakaszokra lokalizált HER2-overexpresszió látható. Immunhisztokémiai reakció (SA-Biotin), 200x nagyítás.



ris carcinomák egy része regrediál, illetve kerül statikus állapotba és nem alakul át invazív carcinomává, hanem az in situ ductalis „rákok” esetében is kiderült, hogy a régebbi nézetekkel ellentétben nem bizonyítható minden esetben a „valóságos” invazív daganattá történő átalakulás (82, 127, 128, 131). A másik fontos, a HER2-expresszió jelentőségét fokozó tényező, hogy az ún. atípusos hyperplasiák (lobularis, ductalis) egyes esetekben minden differenciáldiagnosztikai séma kialakítása mellett rendkívül nehezen különíthetők el az in situ „carcinomáktól”, és a régebben dogmaként elfogadott nekrozis, a myoepithel jelenléte vagy hiánya sem biztos fenotípusos marker (43, 128, 136). A korai neoplastikus transformációk fenotípusos heterogenitása, valamint az a tény, hogy az atípusos proliferációk, in situ rákok környezetében elhelyezkedő ép mirigyhámában is a tumorokra jellemző molekuláris, genetikai hibák vannak jelen, mind arra utalnak, hogy a morfológiai jellegzetességek, heterogenitása mellett az ún. biológiai heterogenitást is vizsgálni kell. Ma már bizonyítottan vehető, hogy azonos szövettani citológiai szerkezet mellett a „biomarkerek”, HER2 proteín, p53 mutációs szuppresszor gén proteín, CD44 glycoprotein v6 izoform expressziójával valószínűsíthetően lehet azokat az eseteket, amelyekből valódi invazív carcinoma alakul ki, és ennek megfelelő terápiás tervet lehet kidolgozni (6, 14, 27, 28, 136, 138).

Saját vizsgálatainkban 10 atípusos lobularis hyperplasiát (ALH), 15 in situ lobularis carcinomát (LCIS), 10 ún. atípusos intraductalis papillomát (IP), 10 atípusos ductalis hyperplasiát (ADH) és 10 intraductalis carcinomát (DCIS) vizsgáltunk.

Megállapítottuk, hogy az in situ „rákok” és az atípusos hyperplasiák lényegében azonos arányban expresszálják a HER2 proteint. A ductalis elváltozásokban nem láttunk morfológiai eltérést a pozitív és a nem festődő esetek között, ezzel szemben az ALH-kban és LCIS-nek csaknem kizárólag a nagysejtes variánsában (lobularis neoplasia B) láttunk HER2-overexpressziót. A vizsgált esetek alacsony száma miatt százalékos arányt nem határoztunk meg, de valamennyi dedifferenciált comedo és nem comedo DCIS esetben HER2-overexpressziót tapasztaltunk (1. táblázat). Nagyobb számú esetünket a Van Nuys klasszifikáció alapján csoportosítottuk és megvizsgáltuk a Silverstein-féle klasszifikáció és a HER2-overexpresszió összefüggését. Megállapítottuk, hogy a „high” grade comedo DCIS-ek rendkívül magas, 85,7%-ban expresszáltak HER2 proteint, de még a nem „high” grade nekrozis nélküli esetek között is csaknem 30%-os volt a pozitivitás (2. táblázat). A DCIS cribriform differenciált típusaiban nem vagy csak minimális pozitivitás volt (1. ábra). A „nagysejtes” ALH-kban és LCIS-ben csak a citoplazmamembrán egyes szakaszain és nem a teljes sejtfelszínén volt overexpresszió (2. ábra). Az ún. apocrin in situ lobularis carcinomában viszont valamennyi sejtfelszínen erős (+++) pozitív membránexpressziót találtunk (3. ábra).

Lobularis és ductalis invazív emlőrákok vizsgálata alkalmával tanulmányoztuk a tumorok

szöveti típusa, differenciáltsága és az egyes eltérő prognózisú speciális vagy ritka formák és a HER2 protein expressziója közötti összefüggéseket, egyes tumorscsoportoknál pedig más biomarkerek pozitívításával vetettük egybe a HER2 receptor membránfestődését.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a ductalis invazív emlőrákokban függetlenül a különféle szöveti típusoktól gyakrabban (31,6%), az invazív lobularis carcinomákban, melyek túlnyomó részét a relatíve jó prognózisú klasszikus forma teszi ki, ritkábban (17%) láttunk HER2-overexpressziót (3. táblázat). Függetlenül a szöveti típustól a nuclearis „grade” és a HER2-expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a Grade I és a Grade II-III maggal rendelkező tumorok HER2-pozitivitásával (11,3, 58 és 87%-os festődés) (4. táblázat).

A HER2-pozitivitás százalékos aránya jól tükrözi az eltérő emlőráktípusok agresszivitását. A relatíve jó prognózisú típusok, myoepithelialis, mucinosus, stb. emlőcarcinomák vagy nem, vagy igen alacsony százalékban expresszálják HER2 proteint. Különösen érdekes, hogy a rossz prognózist jelző ún. tumorsejt-elkülönülést példázó invazív ductalis carcinomák esetében milyen magas a HER2-expresszió (64,7%). Ez a különbség az invazív lobularis rákok speciális szubtypusaiban is kifejeződik. Annak ellenére, hogy a százalékos arányt némileg torzíja az alacsony esetszám – például csak 8 apocrin (AP) lobularis carcinomát tudtunk vizsgálni – mégis a klasszikus, a tubulolobularis, a myoepithelialis, a pleiomorf és az apocrin lobularis rákok közötti különbség nagymértékű (5. táblázat).

A kifejezetten rossz és kedvező prognózisú emlőrák-csoportokban tanulmányoztuk a HER2, a p53, és a CD44v6 expresszióját egyazon tumorban. Megállapítottuk, hogy pozitív összefüggés van a vizsgált biomarkerek között, amennyiben a magas malignitású tumortípusokban a HER2, a p53 és a CD44v6 egyaránt gyakrabban expresszálódik, mint a relatíve jó prognózisú tumorscsoportokban (6., 7. táblázat).

Eredményeink lényegében egyezők az irodalomban közölt adatokkal, amelyek szintén összefüggést találtak a tumortípus, a differenciáltság, a nuclearis atypia és az áttétképző-képesség között. Hasonlóan az irodalmi adatokhoz mi is gyakrabban találtunk HER2-festődést az in situ (80%), mint az invazív (27,8%) rákokban. Az intraductalis carcinomák esetében a HER2-amplifikáció/overexpresszió szorosan összefügg a differenciáltsággal, a rosszul differenciált (comedo) típusok csaknem 100%-ban pozitívak (4. ábra), míg a magasan differenciált típusokban ritkán látni HER2 protein overexpressziót (32, 44, 130, 136, 138, 139, 140).

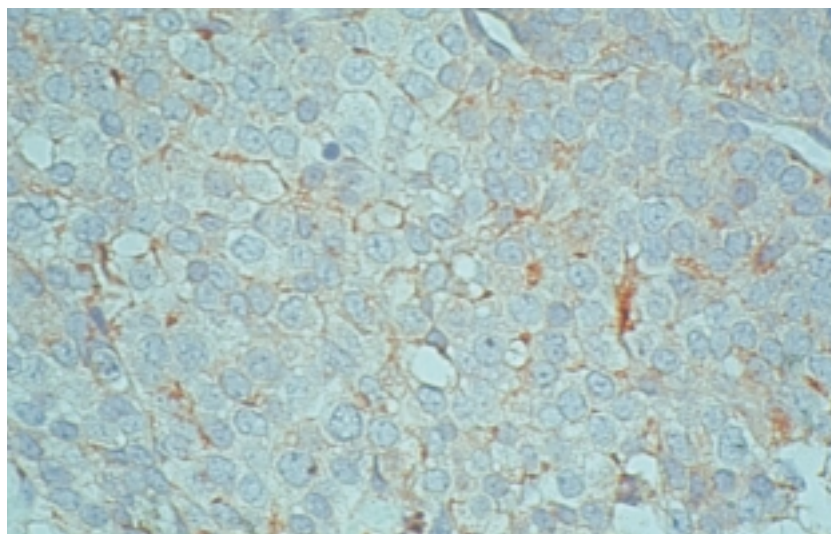
In situ ductalis emlőcarcinomák 60%-ában HER2-pozitivitást találtak, szemben az invazív rákok 30%-os overexpressziójával. A pozitívítás összefügg a differenciáltsággal, a mérettel, a hormonreceptor-státusszal, a sejtproliferációval, a DNS aneuploidióval, a p53 mutációs protein overexpressziójával, Comedo DCIS csaknem

minden esetben HER2-pozitív (69, 70, 136, 137, 138, 148).

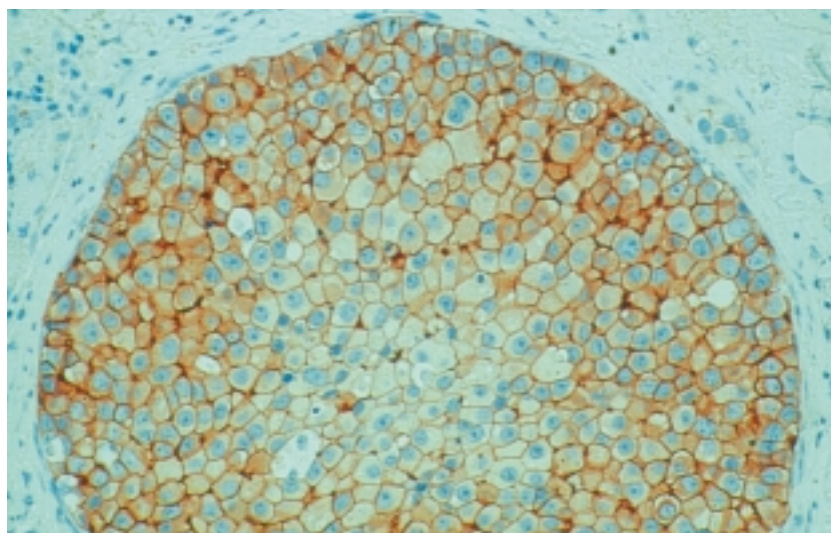
A HER2-státusz az in situ carcinomák biológiai viselkedésének megítélésében is fontos lehet. Feltételezhetően a HER2-pozitív intraductalis vagy in situ lobularis carcinomák túlnyomó része valódi invazív tumorrá fejlődik.

A HER2 protein az invazív emlőrákok különböző típusaiban változó arányban expresszálódik. Érdekes módon a Paget-kór 100%-ban erős membránexpressziót mutat (44, 47, 56, 61, 80, 129). A HER2-expresszió néha segít a malignitás, agresszivitás diagnosztizálásában ritka emlőráktípusok eseteiben is. A cysticus hypersecretiós vagy a clinging carcinoma, ha nincs invazív kom-

2. ábra: LCIS „lobularis neoplasia B” nagysejtes variáns. A sejtmembrán egyes szakaszaira korlátozódó (+ + +) pozitív HER2-festődés. Immunhisztokémiai reakció (SA-Biotin), 200x nagyítás.



3. ábra: Apocrin LCIS. A tumorsejtek teljes felszínén erős (+ + + +) pozitív HER2-festődés. Immunhisztokémiai reakció (SA-Biotin), 100x nagyítás.



3. táblázat: Az alaptípus és a HER2-expresszió összefüggése

	Esetszám	Pozitív esetek (%)
Invazív ductalis	117	37 (31,6)
Invazív lobularis	41	7 (17)

ponense, nem ritkán nehezen különíthető el a proliferatív cysticus nem rákos betegségektől. A rendkívül ritka ún. „lipid-rich” carcinoma agresszív körlefolysú, amit jól tükröz az erős HER2-pozitivitás. Ilyen esetekben a HER2 kifejezett overexpressziója segíti a dignitás megítélését (7. táblázat) (5. ábra).

A HER2-státusz a hormon- és kemoterápia hatékonyságának megítélésére alkalmas predictor

Kísérletes körülmények között megállapították, hogy a HER2-t overexpresszáló emlőráksejtek ösztrogénfüggetlen növekedést mutatnak, ami a kísérletes tumorsejtvonalak antiösztrogén- (tamoxifen) rezisztenciáját jelenti (66, 81). Ezt a klinikai vizsgálatok is megerősítették, amennyiben

4. táblázat:

A nuclearis grade és a HER2-expresszió összefüggése

Nuclearis grade	Esetszám	HER2-expresszió
I	62	7 (11,3%)
II	67	39 (58,2%)
III	31	27 (87,0%)

5. táblázat: Az invazív lobularis carcinoma eltérő prognózisú altípusainak biomarker-expressziója

	Esetszám	Biomarkerek, pozitív esetek száma (%)		
		HER2	p53	CD44v6
Klasszikus	40	15 (37,5)	3 (7,5)	11 (27,5)
Tubulo-lobularis	29	3 (10,3)	1 (3,4)	10 (34,4)
Myoepithelialis	23	3 (13,1)	0 (0)	1 (4,3)
Pleiomorph	19	14 (73,6)	7 (36,8)	16 (84,3)
Apocrin	8	7 (87,5)	5 (62,5)	6 (75)

A biomarkerek expressziója immunhisztokémiával lett meghatározva. Az altípusok dignitását jól tükrözi a biomarkerek pozitivitásának százalékos aránya.

6. táblázat: A szövettani típus és HER2-expresszió összefüggése emlőrákban

Szövettani típus	Esetszám	Pozitív esetek száma (%)
Invazív duct. NST*	46	21 (45,7)
Invazív lobularis	15	2 (13,3)
Inv. duct. sejtelkülönüléssel	17	11 (64,7)
Myoepithelialis	22	1 (4,5)
Medullaris	12	3 (25,0)
Cribiform	11	0 (0)
Mucinosus	13	3 (23,0)
Tubularis	3	0 (0)
Papillaris	3	0 (0)
Paget-kór	7	7 (100)

Pozitív a festődés, ha a sejtek több mint 10%-ában membránexpresszió látható.
*nem speciális típus

a HER2 génamplifikációt mutató esetekre ösztrogénreceptor-negativitás jellemző. Megállapították továbbá, hogy a HER2-t overexpresszáló emberi emlőrákok tamoxifenrezisztensek (5, 15, 18, 30, 39, 94). Az is kiderült, hogy az ösztrogénreceptor státusztól függetlenül a HER2-pozitív esetekben a tamoxifen kezelés eredménytelen. Más vizsgálatok szerint a HER2-overexpresszió erősen lecsökkenti a hormonkezelés (Megestrol acetat, droloxifen, stb) hatásosságát áttétes emlőrákok eseteiben, valamint ha a szérum enzimvizsgálata magas HER2 extracelluláris domain (ECD^{HER2}) szintet mutat ki (67, 144, 145, 146).

A HER2-overexpresszió és az anthracyclin hatásának összefüggései

Ösztrogéndependens MCF-7 emlőráksejtekbe transzfektált HER2 gén nemcsak tamoxifen-, hanem ciszplatinrezisztenciát is létrehoz (11, 15). Számos közlemény alapján megállapítható, hogy a HER2-pozitív tumorok a cyclophosphamid, doxorubicin és 5-FU (CAF) kezelésre jól reagálnak. Más vizsgálatok viszont arra utalnak, hogy pozitív HER2 státusz mellett a CMF (cyclophosphamid, Metotrexat, 5-FU) kezelés relatíve hatástalan volt (22, 62, 95). Újabb ezt a megállapítást nem tudták megerősíteni (97). Klinikai adatok arra utalnak, hogy a HER2-overexpresszió taxanalapú kezeléseknél inkább fokozza az érzékenységet (11, 13, 85, 108, 110, 132).

A HER2 mint az emlőrák kezelésének célmolekulája

A HER2 a rákkezelés megfelelő célmolekulája, mivel gyakran overexpresszálódik emlőtumorokban, ez agresszív klinikai körlefolysást eredményez, és a HER2 ellen termelt monoklonális antitestek laboratóriumi körülmények között gátolják a tumor növekedését (1, 2, 4, 9, 20, 38, 40).

HER2 antiszenz DNS oligomerek a HER2 gén expressziójának „domainregulálására” képesek, ezáltal a ráksejtek a G1 fázisban megállnak, és a sejtproliferáció és a tumoros átalakulás gátolt. Számos kémiai gátlószer a HER2-pozitív ráksejtek HER2 tirozinkináz-aktivitását felfüggeszti, gátolva a tumornövekedést (37, 41, 59, 84, 100, 116).

A trastuzumab lehetséges hatásmechanizmusai

Egér monoklonális antitesteket preparáltak a HER2 protein extracelluláris domainjének különböző epitopjai ellen, majd az immunogenitás lehetőségének legteljesebb kiküszöbölése céljából az antitest molekula 95%-át humán immunoglobulin molekulával helyettesítették, és csak az antigén-antitest-kötődésben döntő szerepet játszó mintegy 5%-nyi molekularész maradt egér eredetű, azaz a molekulát „humanizálták”. Az egyik humanizált anti-HER2 monoklonális antitest hatásos növekedést gátló antitestnek bizonyult (trastuzumab), ezzel elindítva ennek az anyagnak gyógyszerre fejlesztését (65, 83). A kísérletes

vizsgálatok alapján a trastuzumab a következő módokon hat: HER2 receptor-downregulációt eredményez, gátolja a heterodimerek kialakulását, akadályozza a komplexből történő kiszabadulását, a tumorsejteket G_1 fázisban blokkolja, gátolja az angiogenezist, antitest-dependens celluláris citotoxicitást indukál és fokozza a kemoterápiás szerek hatását.

A trastuzumab fázis II és III klinikai vizsgálatokban HER2-overexpressziót mutató áttétes emlőrákos betegekben hatásosnak bizonyult. Az anti-HER2 monoklonális antitest-kezelés nem csak gátolja az emlőrák sejtvonalak növekedését, hanem fokozza a paclitaxel, doxorubicin és cisplatin antitumorális hatását (11). A trastuzumab kiperarálása így elsőként nyújt lehetőséget egy a tumorkialakulásban és progresszióban szerepet játszó onkoreceptor hatásának direkt befolyásolására, valamint ezen onkoreceptorra ható célzott kezelésre, a HER2 proteint overexpresszáló metastatikus emlőrákokban (64).

A HER2-státusz tesztelése

HER2-re célzott kezelés megköveteli, hogy a HER2-amplifikáció/overexpresszió rutin meghatározása a legmegfelelőbb standardizált módszerrel történjen. A génamplifikáció meghatározására a fluoreszcens in situ hibridizációt (FISH) és az ún. Southern blot módszert használják, míg a HER2 protein overexpresszióját szövetekben immunhisztokémiával (IHC), szérumban ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel vizsgálják (71, 72).

Nagyon fontos előnye az IHC és FISH metodikáknak, hogy tűbiopsziával nyert citológiai kenetekben is elvégezhető a vizsgálat, valamint, hogy standardizált technikák állnak rendelkezésünkre.

A fenti módszerek nagy része rutin meghatározásra alkalmatlan és csak speciális kutatólaboratóriumokban végezhető. A szérvizsgálatokra legalkalmasabb módszerek az IHC, a FISH és az ELISA módszer.

Emlőráksejtekben az amplifikálódott gének megemelik a HER2 protein szintjét. Paraffin metszeteken IHC-vel a tumorsejtek erős membránfestődést adnak, míg normális génkópiaszám mellett nincs pozitívitas. Szobahőmérsékleten tartott formalinfixált metszetekben a HER2 kimutathatósága időarányosan csökken.

Az eltérő eredmények okai között a különféle fixálás, a feldolgozás, ill. beágyazás hőmérséklete, a festetlen metszetek tárolásának időtartama és a használt antitestek eltérő minősége valamint a festési eljárás alkalmassága mind szerepet játszik. Ma már általánosan elfogadott, hogy a fenti hibalehetőségek ellenére a HER2 protein rutin vizsgálatára standardizált megfelelő quality controllal ellenőrzött esetleg automatizált immunhisztokémia a legalkalmasabb. A génamplifikáció kimutatására használt FISH metodika nagyon érzékeny speciális HER2 antiszenz oligonucleotidokkal dolgozik, amelyhez markerként digoxigenint kapcsolnak. Ezt követi a metszetben levő HER2-vel történő hibridizáció. A kimutatást

immunfluoreszcenciával végzik, digoxigenin elleni fluoreszcinnel jelzett antitestet használva. Ma még inkább kutatási szintű vizsgálatról van szó. Ezt a módszert is formalinban fixált paraffin metszeteken lehet végezni, szenzitivitása a tárolással nem csökken.

A DAKO immunhisztokémiai vizsgálatra szemi-kvantitatív rendszert dolgozott ki, a membránfestődés mértékének és kiterjedtségének kiértékelésére. Ha egyazon metszeten végezzük el a FISH és IHC módszerrel a HER2 gén amplifikációjának ill. a protein expressziójának vizsgálatát, a génamplifikáció alacsonyabb százalékban mutatható ki, sőt ritkán génamplifikáció jelenléte mellett sincs HER2 protein pozitívitas (76, 77).

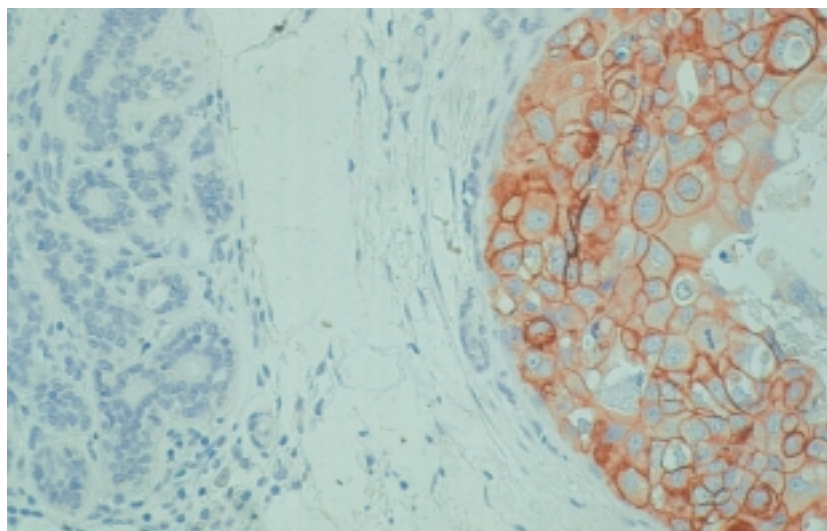
ELISA módszer használható HER2 protein mérésére friss tumor cytosol frakcióban és vér szérumban. Az eredmények bizonyos mértékig

7. táblázat:
Immunfenotípusos prognosztikai markerek szerepe a ritka emlőrákféleségek dignitásának megítélésében

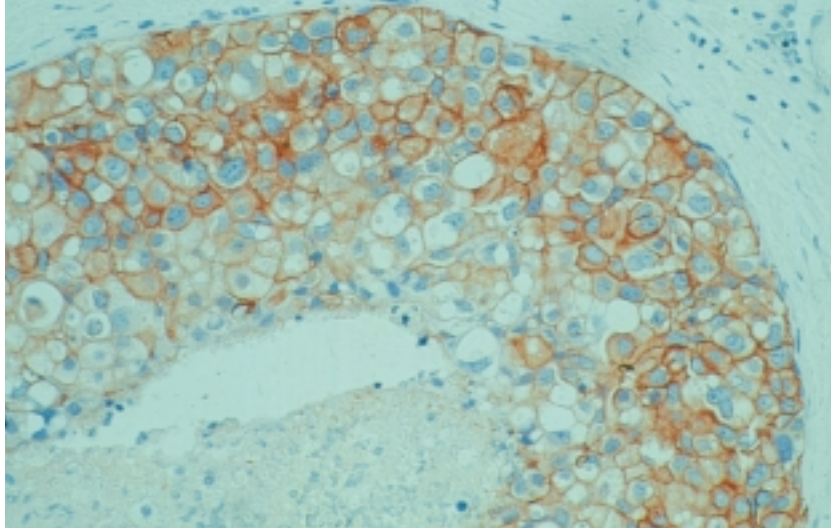
Szöv. típus	VIM	HER2	p53	CD44	MT	PCNA	ÖR
Cysticus hypersecretiós							
1	+	-	-	-	+	<5%	-
Lipid-rich							
1	-	++	-	++	+	<20%	-
2	-	++	++	+	+	<20%	-
3	-	+-	-	+-	-	->20%	-
Lobularis apocrin							
1	+	-	+	+	-	<20%	-
2	+	-	-	++	+	<20%	-
Merkel-like							
1	+	-	+	+	+	>20%	-
2	-	+	+	+	++	<20%	-
Mucinosus myoepithelialis							
1	+	-	-	-	-	<5%	+
2	-	+-	-	-	-	<5%	+

Pozitívitas jelölése; néhány sejt: -; <10%: +; 10–50%: +; >50%: ++
VIM: vimentin, MT: metalloproteináz, PCNA: proliferációs nukleáris antigén
A lipid-rich, az apocrin és a neuroendocrin emlőrákok agresszív biológiai viselkedését jól tükrözi a biomarkerek (VIM, HER2, p53, CD44, MT) gyakori és nagy arányú expressziója.

4. ábra: Dedifferenciált (Grade 3) in situ comedo carcinoma. Erős HER2-membrán-expresszió valamennyi sejt felszínén. Az ép emlőmirigy hámsejtjei nem expresszálják HER2 proteint. Immunhisztokémiai reakció (SA-Biotin), 100x nagyítás



5. Ábra: „Lipid-rich” emlőcarcinoma intraductális komponense. Erős HER2 membránfestődés valamennyi sejtfelszínen. Immunhisztokémiai reakció (SA-Biotin), 100x nagyítás



ellentmondásosak. Szérum ELISA-val speciálisan a HER2-receptor extracelluláris domainjét (ECD^{HER2}) egy 100-110 kD-s proteint lehet mérni, amely a HER2-pozitív tumorból kerül a plazmába. Ezt a proteint néha mint neurelated proteint (NRP) írják le (60).

Az ECD^{HER2} lehasítása speciális metalloproteinázok révén történik. Ezáltal nincs valódi összefüggés az ECD^{HER2} szint és a HER2 protein overexpressziója között.

szefüggés az ECD^{HER2} szint és a HER2 protein overexpressziója között.

A HER2-státusz vizsgálata

A HER2 protein egyes részei lehasadva a receptormolekuláról a vérpályába kerülhetnek és lehetővé teszik a tumorprogresszió követését ELISA módszer segítségével (11).

A HER2-státusz mérésére használt módszerekkel nyert eredmények egy része ellentmondó. Ezért ma már általánosan elfogadott követelmény, hogy

- a/ a minőségi kontrollal ellenőrzött módszereknek egységesnek, azonosnak kell lenni,
- b/ csak standardizált antitestek használhatók immunhisztokémiai vizsgálatra,
- c/ az eredményeket közös megegyezéses alapon kimunkált grading és pontozásos séma szerint lehet kiértékelni,
- d/ az eredmények közlése csak standardizált rendszerben kivitelezhető,
- e/ a különböző laboratóriumok eltérő vizsgálati módszerrel nyert eredményei összehasonlíthatók legyenek,
- f/ a IHC-vel paraffin metszeteken vizsgált HER2-jelölés stabilitását az idő függvényében kell értékelni, meghatározni (Albain és mtsai 1999. után módosítva).

A HER2-státusz mérésére számos módszer használható (8. táblázat).

8. táblázat: A HER2-státusz mérésére alkalmas módszerek

Módszer	A vizsgálat tárgya	Specimen
Immunhisztokémia (IHC)	HER2 receptor-protein	fagyasztott és paraffin metszet
Enzimmel kapcsolt immunabszorpció vizsgálat (ELISA)	A vérszérum HER2 proteinje	vérszérum (natív)
Western blot	HER2 protein	friss fagyasztott szövet
Southern blot, slot blot	HER2 génekópia-szám	friss fagyasztott szövet
Northern blot, dot blot	HER2 mRNS	friss fagyasztott szövet
Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)	HER2 génekópiaszám	paraffin metszet

Az IHC módszer előnyei

- a/ A HER2 protein expressziója pontosan lokalizálható.
- b/ Nagyon érzékeny és viszonylag gyors módszer.
- c/ Általánosan használt, elfogadott.
- d/ Kevés reagens szükséges a reakcióhoz.
- e/ A vizsgálatához a kórházi klinikai laboratóriumokban megtalálható eszközök elegendőek.
- f/ Mind fagyasztott, mind paraffin metszeteken elvégezhető.
- e/ Viszonylag olcsó.

9. táblázat: A membránfestődés intenzitásának kritériumai (DAKO) „HercepTest”

Festődés mintázata	pontozás	HER2-overexpresszió megítélése
1. Nincs membránfestődés vagy a tumorsejtek kevesebb mint 10%-ában gyenge reakció	0	negatív
2. A tumorsejtek több mint 10%-ában finom membránfestődés	1+	negatív
3. A tumorsejtek több mint 10%-ában az egész sejtfelszínen gyenge vagy mérsékelt membránfestődés	2+	gyengén pozitív
4. A tumorsejtek több mint 10%-ában az egész sejtfelszínen erős membránfestődés	3+	erősen pozitív

A FISH módszer előnyei és hátrányai

- a/ Nagyon szenzitív.
- b/ Az IHC-nél több lépcsőből áll a reakció.
- c/ Speciális antiszenz oligonukleotid reagenseket igényel.
- d/ Speciális műszerezettség szükséges a módszerhez.
- e/ Speciális laboratóriumi feltételeket igényel, fluoreszcens mikroszkóp, stb.
- f/ Drágább, mint az IHC.

A továbbiakban részletesen ismertetjük azt a szemikvantitatív immunhisztokémiai metodikát, amelyet a DAKO cég „HercepTest” néven hozott forgalomba.

A „HercepTest” kétlépcsős immunhisztokémiai reakció, amely paraffin metszeteken is elvégezhető. A 3-4 mikron vastagságú metszeteket, poly-L-lysinnel kezelt vagy szilanizált tárgylemezre felhúzza, szobahőmérsékleten (20-25°C)

végezzük a reakciót. Célszerű, hogy a neutrális formalinban történő fixálás ideje ne legyen túl hosszú (20-30 óra) és a paraffin beágyazás alkalmával az olvasztott paraffin hőmérséklete ne haladja meg a 60°C fokot. A kisserelt „HercepTest” 6 hónapig eltartható 6-8°C fokos hőmérsékleten.

A szobahőmérsékleten elvégezhető reakció „lépései” a következők.

1. lépés: Antigén epitop feltárás („retrieval”)

A metszettartó edényt vízfürdőbe kell helyezni. Az edénybe „Vial7” epitope retrieval oldatot (1:10 arányban desztillált vízzel hígított) öntünk, a vízfürdőt és a retrieval oldatot felmelegítjük 95-99°C fokra. A deparaffinált metszeteket az előmelegített pufferrel telt edénybe helyezzük, és miután 95-99°C fokra felmelegedett, ezen a hőmérsékleten 40 ± 1 percig inkubáljuk. Kiemelve a metszettartó edényt a vízfürdőből, a pufferben levő metszeteket 20 ± 1 percig lehűtjük szobahőmérsékletre.

2. lépés: Peroxidáz-blokkolás

Leöntjük és leszűrjük a felesleges puffert és leszárítjuk a tárgylemezt a specimen körül a maradék folyadékot eltávolítva. A blokkoló reagenssel lefedjük és inkubáljuk a metszeteket. 5 ± 1 perc inkubálás után desztillált vízzel leöblítjük, és friss pufferfürdőbe (Tris/HCl + detergens + antimikrobiális szer 1:10 arányú desztillált vizes oldata) helyezzük.

3. lépés: Az elsődleges antitestet tartalmazó vagy negatív kontroll reagenssel történő inkubálás

A felesleges puffer leöntése, leszívása után a metszetet 100 mikroliter elsődleges antitest vagy negatív kontroll reagenssel lefedjük. 30 ± 1 perces inkubálás következik. Ezután mosópufferes (Tris/HCl) óvatos öblítés, és friss pufferfürdőbe helyezés történik.

4. lépés: Vizualizációs reagenssel történő kezelés

A vizualizációs reagens dextrán polimer vázhoz kapcsolt tormagyökér peroxidáz és kecske antinyúl immunglobulin molekulából áll, amely TRIS/HCl puffert, stabilizáló proteint és mikrobaellenes szert tartalmaz. A felesleges puffer leöntése és leszívása után a metszetet 100 mikroliter vizualizációs reagenssel fedjük le. 30 ± 1 perces inkubálás után mosópufferes öblítés következik.

5. lépés: Substrat-Chromogen oldattal történő kezelés (DAB)

A puffer leöntése és leszívása után a metszetet 100 mikroliter substrat-chromogen oldattal fedjük, ezt követi 10 ± 1 perces inkubálás, majd óvatos desztilláltvizes öblítés.

6. lépés: Haematoxylinnal ellenfestés

A haematoxylin-oldat koncentrációjától függően 2-5 percre a metszeteket a festékkoldatba kell helyezni, ezután óvatos desztillált vizes öblítés (optimalisan 10-szer 37 mmol/liter ammóniavízbe meríteni). Ismételt desztillált vizes öblítés 2-5 percig.

7. lépés: lefedés

Mind a nem vizes, mind a vizes fedőanyagok használhatók, de a permanens nem vizes fedőanyagok ajánlatosak. A vizes fedőanyagok mellett a reakció 1 hét alatt elhalványulhat.

A festődés minőségi kontrollja

A minőségi kontrollt megkönnyíti, hogy a DAKO cég kontroll metszeteket is szolgáltat a „HercepTest” készlethez.

A „quality” kontroll célja, hogy a kapott eredményeket összehasonlíthatóvá tegye, és valódiságát bizonyítsa. Ennek elérésére a legmegfelelőbb a készlettel együtt érkezett ülepített emberi emlőrák-sejtvonalak formalinfixált, paraffinba ágyazott metszeteinek azonos módon történő vizsgálata.

A pozitív kontroll szövet

A legmegfelelőbb erre a célra a gyengén pozitív (2+) HER2-expresszióval rendelkező emlőrák, amely a leginkább jelezni képes azonos tehnikai feltételek mellett az elsődleges antitest szenzitivitását (DAKO ajánlás).

Negatív kontroll szövet

A HER2 protein-negatív szövetek – mint pl. colon, máj, pajzsmirigy vizsgálati anyaggal azonos módon feldolgozott és festett metszetei – szolgálhatnak erre a célra. Ha ezeken a metszeteken specifikus festődést észlelünk, a reakció érvénytelen, ismételni kell.

A festődés értékelése

Csak a membránfestődés értékelhető a HER2 receptorprotein overexpressziója jeleként. A citoplazmatikus festődést aspecifikusnak kell tekinteni (9. táblázat).

A klinikai és genetikai vizsgálati eredményekkel egybevetve a HercepTest 85%-os egyezést mutatott, ugyanakkor a reakció megbízhatósága 95%-os, a pozitív és negatív esetekre vonatkoztatva. Terápiás lehetőségként a trastuzumab kezelés célzottan a HER2-overexpressziót mutató esetekben jön szóba.

Meg kívánjuk jegyezni, hogy a 10%-os festődési határérték önkényesnek tűnik, mivel a hormonreceptorok pozitivitásának meghatározására egy bizonyos ideig ezt a küszöbértéket tekintették a pozitív kritériumának, amit később 20%-ra emeltek. A nagyszámú tumoron végzett vizsgálatunkban azt találtuk, hogy pozitív esetekben a tumorsejtek legalább 30%-a mutat membránexpressziót. Valószínűleg idővel, amikor már nagy anyagon végzett vizsgálatok statisztikai kiértékelése elvégezhető, esetleg változni fog a szemi-kvantitatív küszöbérték.

Irodalom

1. Aguilar Z, Akita RW, Finn RS, et al. Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene* 18:6050-6062, 1999
2. Albain KS, Hortobagyi G, Ravdin P, et al. HER2 Overexpression in breast cancer. Monograph, Roche, 1998

3. Albonico G, Guerroli P, Ferretti S, et al. Biophenotypes of breast carcinoma in-situ defined by image analysis of biological parameters. *Pathol Res Pract* 192:117-123, 1996
4. Alexiev BA, Bassarova AV, Popovska SL, et al. Expression of c-erbB-2 oncogene and p53 tumor suppressor gene in benign and malignant breast tissue: correlation with proliferative activity and prognostic index. *Sem Diagn Pathol* 142:271-279, 1997
5. Atlas for Interpretation of Hercep Test™ Staining. DAKO code No. K 5204 1999
6. Baak JPA, Chinc D, van Diest PJ, et al. Comparative long-term prognostic value of quantitative HER-2/neu protein expression, DNA ploidy, and morphometric and clinical features in paraffin-embedded invasive breast cancer. *Lab Invest* 64:215-223, 1991
7. Babiak J, Hugh J, Poppema S. Significance of c-erbB-2 amplification and DNA aneuploidy. *Cancer* 70:770-776, 1992
8. Barnes DM, Lammie GA, Millis RR, et al. An immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 expression in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 58:448-452, 1988
9. Barnes DM, Meyer JS, Gonzalez JG, et al. Relationship between c-erbB-2 immunoreactivity and thymidine labelling index in breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treatm* 18:11-17, 1991
10. Barnes DM, Bartkova J, Camplejohn RS, et al. Overexpression of the c-erbB-2 oncogene: why does this occur more frequently in ductal carcinoma in situ than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance? *Eur J Cancer* 28:644-648, 1992
11. Baselga J, van de Vijver M. HER-2 Monograph, Roche 1999
12. Baselga J. Preclinical effects of anti-HER2 monoclonal antibodies. HER2 State-of-the-Art Conference Montreux, Switzerland, Abstract pp. 20. 1999
13. Baselga J, Seidman AD, Rosen PP, et al. HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: therapeutic implications. *Oncology* 11:43-48, 1997
14. Beerli RR, Hynes NE. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 271: 6071-6076, 1996
15. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 24:85-95, 1993
16. Blin N, Kardas I, Welter C, et al. Expression of the c-erbB2 proto-oncogene in male breast carcinoma: Lack of prognostic significance. *Oncology* 50:408-411, 1993
17. Borden EC, Esserman L, Linder DJ, et al. Biological therapies for breast carcinoma: concepts for improvement in survival. *Semin Oncol* 26:28-40, 1999
18. Breuer B, Smith S, Thor A, et al. ErbB-2 protein in sera and tumors of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 49:261-270, 1998
19. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al.: c-erbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14:2702-2708, 1996
20. Cefai D, Morrison BW, Sckell A, et al. Targeting Her-2/neu for active-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer. *Int J Cancer* 83: 393-400, 1999
21. Chazin VR, Kaleko M, Miller AD, et al. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7:1859-1866, 1992
22. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol* 16:470-479, 1998
23. Cooke T, HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. HER2 State-of-the-Art Conference Montreux Switzerland Abstract pp. 16, 1999
24. Couch FJ, Wang XY, Wu GJ, et al. Localization of PS6K chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Res* 59:1408-1411, 1999
25. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230:1132-1139, 1985
26. Dahiya R, Deng G. Molecular prognostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52:185-200, 1998
27. Davies BR, Platt-Higgins AM, Schmidt G, et al. Development of hyperplasias, preneoplasias, and mammary tumors in MMTV-c-erbB-2 and MMTV-TGFalpha transgenic rats. *Am J Pathol* 155:303-314, 1999
28. Dawkins HJS, Robbins PD, Smith KL et al. What's New in Breast Cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene c-erbB-2 in prognosis and disease. *Path Res Pract* 189:1233-1252, 1993
29. De Cremous P, Martin EC, Vincent-Salomon A. Quantitative PCR analysis of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification and comparison with p185(HER2/neu) protein expression in breast cancer drill biopsies. *Int J Cancer* 83:157-161, 1999
30. De Potter C.R. The neu-oncogene: More than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 25:1264-1268, 1994
31. De Potter CR, Beghin C, Makar AP, et al. The neu-oncogene protein as a predictive factor for haematogenous metastases in breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 45:55-58, 1990
32. De Potter CR, Foschini MP, Schelfhout A-M, et al. Immunohistochemical study of neu protein overexpression in clinging in situ duct carcinoma of the breast. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 422: 375-380, 1993.
33. De Potter CR, Schelfhout A-M, Verbeeck P, et al. Neu overexpression correlates with extent of disease in large cell ductal carcinoma in situ of the breast. *Hum Pathol* 26:601-606, 1995
34. Depowski PL, Brien TP, Sheehan CE, et al. Prognostic significance of p34cdc2 cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and Her-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 112:459-469, 1999
35. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH et al. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237:178-82, 1987
36. Di Giovanna MP. Clinical significance of HER-2/neu overexpression: Part II. *Cancer Princ Pract Oncol* 10: 1-14, 1999.
37. Discafani CM, Carroll ML, Floyd MB, Jr, et al. Irreversible inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with in vivo activity by N-4-(3-bromophenyl) amino/-6-quinazoliny/-2-butylamide (CL-387,785). *Biochem Pharmacol* 57:917-925, 1999
38. Drebin JA, Link VC, Stern DF, et al. Down Modulation of an Oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 41:695-706, 1985
39. Elledge RM, Ciocca DR, Langone G. et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2/neu protein in breast cancers from pregnant patients. *Cancer* 71: 2499-2506, 1993
40. Esserman LJ, Loper T, Montes R, et al. Vaccination with the extracellular domain of p185neu prevents mammary tumor development in neu transgenic mice. *Cancer Immunol Immunother*, 47:337-342, 1999
41. Falcioni R, Antonini A, Nistico P, et al. Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 236:76-85, 1997
42. Farabegoli F, Ceccarelli C, Santini D, et al. c-erbB-2 overexpression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int J Cancer* 84:273-277, 1999
43. Fiche M, Avet-Loiseau H, Heymann MF, et al. Genetic alterations in early-onset invasive breast carcinomas: correlation of c-erbB-2 amplification detected by fluorescence in situ hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype. *Int J Cancer* 84:511-515, 1999
44. Gago FE, Tello OM, Diblasi AM, et al. Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:431-437, 1998

45. Giai M, Roagna R, Ponzone R et al. Prognostic and predictive relevance of C-erbB2 and ras expression in node-positive and negative breast cancer. *Anticancer Res* 14:1441-1450, 1994
46. Giani C, Casalini P, Pupa SM, et al. Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation. *Oncogene* 17:425-432, 1998
47. Göhring U-J, Vierbuchen M, Scharl A.: Der immunohistochemische Nachweis des Onkoproteins p185^{erbB2}. Marker einer ungünstigen Prognose beim primären Mammakarzinom. *Tumordiagn u Ther* 14:26-31, 1993
48. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, et al. ErbB/2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655, 1997
49. Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 15:1182-1191, 1995
50. Grootclaes M, Vermimmen D, Plaza S, et al. A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 59:2527-2531, 1999
51. Guerra-Vladusic FK, Scott G, Weaver V, et al. Constitutive expression of Heregulin induces apoptosis in an erbB-2 overexpressing breast cancer cell line SKBr-3. *Int J Oncol* 5:883-892, 1999
52. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 63:434-438, 1991
53. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, et al. c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 58: 453-457, 1988.
54. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int. J Cancer* 42:842-845, 1988
55. Guy CT, Webster MA, Schaller M, et al. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10578-10582, 1992
56. Haerslev T, Jacobsen GK. An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis. *Hum Pathol* 26:295-301, 1995
57. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol* 12:827-34, 1999
58. Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, et al. HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization allows risk-group assessment in node-negative breast cancer. *In J Oncol* 14:663-671, 1999
59. Hartmann F, Horak EM, Cho C, et al: Effects of the tyrosine-kinase inhibitor geldanamycin on ligand-induced HER-2/neu activation, receptor expression and proliferation of Her-2-positive malignant cell lines. *Int J Cancer* 70:221-229, 1997
60. Hayes DF, Cirrincione C, Carney W, et al. Elevated circulating HER-2 neu related protein (NRP) is associated with poor survival in patients with metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 12:58a, 1993
61. Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, et al. C-erbB-2 oncogene product expression depends on tumour type and is related to oestrogen receptor and lymph node status in human breast carcinoma. *Path Res Pract* 189:261-266, 1993
62. Hengstler JG, Lange J, Kett A, et al. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase II alpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 59:3206-3214, 1999
63. Hohaus S, Funk L, Martin S, et al. Stage III and oestrogen receptor negativity are associated with poor prognosis after adjuvant high-dose therapy in high-risk breast cancer. *Br J Cancer* 79:1500-1507, 1999
64. Hortobagyi GN, Hung MC, Buzdar AU. Recent developments in breast cancer therapy. *Semin Oncol* 26:11-20, 1999
65. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, et al. p185^{HER2} monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-1172, 1989
66. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, et al. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 79:1220-1226, 1999
67. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* 26:51-59, 1999
68. Ignatoski KM, Lapinte AJ, Radany EH, et al. erbB-2 overexpression in human mammary epithelial cells confers growth factor independence. *Endocrinology* 140: 3615-3622, 1999
69. Inaji H, Koyama H, Motomura K, et al. Differential distribution of ErbB-2 and pS2 proteins in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 37:89-92, 1996
70. Isola JJ, Holli K, Oksa H, et al. Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer* 73: 652-658, 1994
71. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1974, 1999
72. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, et al. Determination of HER-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 13:37-45, 2000
73. Jinno H, Steiner MG, Mehta RG, et al. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in HER-2/neu oncogene transformed human mammary epithelial cells by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Carcinogenesis* 20:229-236, 1999
74. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229:974-976, 1985
75. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stromaderived growth factors. *Proc Natl Acad Sci* 96:4995-5000, 1999
76. Klijanienko J, Couturier J, Galut M, et al. Detection and quantitation by fluorescence in situ hybridization (FISH) and image analysis of HER-2/neu gene amplification in breast cancer fine-needle samples. *Cancer* 87:312-318, 1999
77. Koscielny S, Terrier P, Daver A et al: Quantitative determination of c-erbB-2 in human breast tumours: potential prognostic significance of low values. *Eur J Cancer* 34:476-481, 1998
78. Kurebayashi J, Otsuki T, Tang CK, et al. Isolation and characterization of a new human breast cancer cell line, KPL-4, expressing the Erb B family receptors and interleukin-6. *Br J Cancer* 79:707-717, 1999
79. Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 187:272-278, 1999
80. Lammie GA, Barnes DM, Millis RR, et al. An immunohistochemical study of the presence of c-erbB-2 protein in Paget's disease of the nipple. *Histopathology* 15:505-514, 1989
81. Larsen SS, Egeblad M, Jaattela M, et al. Acquired anti-estrogen resistance in MCF-7 human breast cancer sublines is not accomplished by altered expression of receptors in the ErbB-family. *Br Cancer Res Treatm* 58: 41-56, 1999
82. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, et al. Elevated serum c-erbB2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 13:1129-1135, 1995
83. Lewis GD, Figari I, Fendly B et al. Differential responses of the human tumor cell lines to anti-p185^{HER2} monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37: 255-263, 1993
84. Liu E, Thor A, He M, et al. The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene* 7:1027-1032, 1992
85. Lopez AM, Pegram MD, Slamon DJ, et al. A model-based approach for assessing in vivo combination therapy interactions. *Proc Natl Acad Sci* 96:13023-13028, 1999

86. Malamou-Mitsi VD, Syrou M, Georgiu I, et al. Analysis of chromosomal aberrations in breast cancer by comparative genomic hybridization (CGH). Correlation with histoprognotic variables and c-erbB-2 immunoe-expression. *J Exp Clin Cancer Res* 18:357-361, 1999
87. Mezzelani A, Alasio L, Bartoli C, et al. c-erbB2/neu gene and chromosome 17 analysis in breast cancer by FISH on archival cytological fine-needle aspirates. *Br J Cancer* 80:519-25, 1999
88. McManus DT, Patterson AH, Maxwell P, et al. Fluorescence in situ hybridisation detection of erbB2 amplification in breast cancer fine needle aspirates. *Mol Pathol* 52:75-77, 1999
89. Menard S, Tagliabue E, Campiglio M, et al. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J. Cell Physiol.* 182:150-162, 2000
90. Mitchell MS, Press MF. The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Semin Oncol* 26:108-116, 1999
91. Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 330:1260-1266, 1994
92. Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, et al. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res* 59:5464-5470, 1999
93. Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, et al. Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Path Oncol Res* 5:255-271, 1999
94. Newby JC, Johnston SRD, Smith IE, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and C-erb B2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 3:1643-1651, 1997
95. Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, et al. Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 76:917-922, 1997
96. Nistico P, Mottolise M, Mammi C, et al. Low frequency of ErbB-2 proto-oncogene overexpression in human leukocyte antigen-A2-positive breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 89:319-321, 1997
97. Okuyama N, Hatano Y, Park Y. Quantitation of c-erbB-2 gene amplification in breast cancer tissue by competitive PCR. *Tumour Biol* 20:153-161, 1999
98. Paik S, Bryant J, Park C, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:1361-1370, 1998
99. Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al. 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* 8:103-112, 1990
100. Park BW, O'Rourke DM, Wang Q, et al. Induction of the Tat-binding protein 1 gene accompanies the disabling of oncogenic erbB receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci* 96: 6434-6348, 1999
101. Parkes HC, Lillycrop K, Howell A, et al. C-erbB2 mRNA expression in human breast tumours: comparison with c-erbB2 DNA amplification and correlation with prognosis. *Br J Cancer* 61:39-45, 1990
102. Patterson A, Harris AL. Molecular chemotherapy of breast cancer. *Drugs Aging* 14:75-90, 1999
103. Pauley RJ, Gimotty PA, Paine TJ. INT2 and ERBB2 amplification and ERBB2 expression in breast tumors from patients with different outcomes. *Breast Cancer Res Treat* 37:65-76, 1996
104. Pegram MD, Slamon DJ. Combination therapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin Oncol* 26:89-95, 1999
105. Pegram MD, Hsu S, Lewis G, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18:2241-51, 1999
106. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 52:65-77, 1998
107. Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-1/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151:1523-1530, 1997
108. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR et al. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 9: 1829-1838, 1994.
109. Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, et al. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 17:2235-2249, 1998
110. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, et al. Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 59:1347-1355, 1999
111. Poller DN, Galea M, Pearson D, et al. Nuclear and flow cytometric characteristics associated with overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treatm* 20:3-10, 1991
112. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q 12-21.32. *Genomics* 4:362-366, 1989
113. Press MF, Hung G, Godolphin W, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples. Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 54:2771-2777, 1994
114. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 15:2894-2904, 1997
115. Quian X, O'Rourke DM, Fei Z, et al. Domain-specific interactions between the p185(neu) and epidermal growth factor receptor kinases determine differential signaling outcomes. *J Biol Chem* 274:574-583, 1999
116. Roh H, Pippin J, Boswell C, et al. Antisense oligonucleotides specific for the HER-2/neu oncogene inhibit the growth of human breast carcinoma cells that overexpress HER2/neu. *J Surg Res* 77:85-90, 1998
117. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 112 (1 Suppl 1):S53-67, 1999
118. Ross JS, Fletcher JA. The Her-2/neu oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 3:237-252, 1998
119. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol* 9:125-38, 1999
120. Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)* 79:27-33, 1998
121. Schimmelpenninck H, Eriksson ET, Falkmer UG, et al. Expression of the c-erbB-2 proto-oncogene product and nuclear DNA content in benign and malignant human breast parenchyma. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 420: 433-440, 1992
122. Seshadri R, Horsfall DJ, Fircgair F, et al. The relative prognostic significance of total Cathepsin D and HER-2/neu oncogene amplification in breast cancer. *Int J Cancer* 56:61-65, 1994
123. Shoker BS, Sloane JP. DCIS grading schemes and clinical implications. *Histopathology* 35:393-400, 1999
124. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-235, 1987
125. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712, 1989
126. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269: 14661-14665, 1994

127. Smith CA, Pollice AA, Brown Gu LP, et al. Correlations among p53, HER-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinomas. *Clin Cancer Res* 6:112-126, 2000
128. Stoll BA. Premalignant breast lesions: role for biological markers in predicting progression to cancer. *Eur J Cancer* 35:693-7, 1999
129. Solomides CC, Zimmerman R, Bibbo M. Semiquantitative assessment of c-erbB-2 (HER-2) status in cytology specimens and tissue sections from breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 21:121-125, 1999
130. Soomro S, Shousha S, Taylor P, et al. c-erbB-2 expression in different histological types of invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 44:211-214, 1991
131. Stark A, Hulka BS, Novotny S, et al. HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol* 18:267-274, 2000
132. Stål O, Sullivan S, Wingren S, et al. c-erbB-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer. *Eur J Cancer* 31A:2185-2190, 1995
133. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. ERBB-2 (HER-2/neu) gene copy number, p185^{HER-2} overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 55:5400-5407, 1995
134. Tavassoli M, Quirke P, Farzaneh F, et al. c-erbB-2/c-erbA co-amplification indicative of lymph node metastasis, and c-myc amplification of high tumour grade, in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 60:504-510, 1989
135. Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, et al. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 12:419-426, 1992
136. Tóth J. Study on the biological behavior of precancerous alterations and carcinomas in situ of the breast based on the expression of biomarkers. XXI. Internat. Congress of the Internat. Academy of Pathology, Budapest, Pathology International 46: Suppl. 1. Abstr. No. 78, 1996
137. Tóth J, Vereczkey I. Ritka emlőrákok patológiája. *Magy. Path. Társ. Kongresszusa Szeged, Abstr. p. 58, 1995*
138. Tóth J, Zalay Zs, Vereczkey I. CD-44 glycoprotein expression in rare subtypes of breast cancer. 9th International Congress on Breast Diseases Huston, Abstr. p. 279, 1996
139. Tsuda H, Iwaya K, Fukutomi T, et al. p53 mutations and c-erbB-2 amplification in intraductal and invasive breast carcinomas of high histologic grade. *Jpn J Cancer Res* 84:394-401, 1993
140. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Immunohistochemical study on overexpression of c-erbB-2 protein in human breast cancer: Its correlation with gene amplification and long-term survival of patients. *Jpn J Cancer Res* 81:327-332, 1990
141. van de Vijver MJ, Peterse J L, Mooi WJ, et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 319:1239-1245, 1988
142. Watanabe M, Wallace PK, Keler T, et al. Antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of breast cancer cells mediated by bispecific antibody, MDX-210. *Br Cancer Res Treat* 53:199-207, 1999
143. Vargas-Roig LM, Gago TE, Tello O, et al. c-erbB-2 (HER-2/neu) protein and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 84:129-34, 1999
144. Willsher PC, Beaver J, Pinder S, et al. Prognostic significance of serum c-erbB-2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 40:251-255, 1996
145. Wu Y, Khan H, Chillar R, et al. Prognostic value of plasma HER-2/neu in African American and Hispanic women with breast cancer. *Int J Oncol* 14:1021-1037, 1999
146. Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, et al. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the Her-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* 15:2518-25, 1997
147. Yarden J. Basic biology of HER2 State-of-the-Art Conference. Montreux Switzerland, Abstr. p. 6, 1999
148. Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene* 18:731-738, 1999
149. Zafrani B, Leroyer A, Fourguet A, et al. Mammographically - detected ductal in situ carcinoma of the breast analyzed with a new classification progesterone receptors, p53 and c-erbB-2 proteins and proliferative activity. *Sem Diagn Pathol* 11:208-214, 1994

A közleményben szereplő adatok, következtetések és vélemények a hivatkozott források és a szerzők nézeteit képviselik, és nem tekintendők a Roche hivatalos álláspontjának.