

DOI: 10.26693/jmbs07.06.006

УДК 618.19-006.6-02-092-07-037

Захарчук С. В.

ESR1-МУТАЦІЇ ЯК ПРЕДИКТОР ПРОГРЕСІЇ ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ ГОРМОНОЗАЛЕЖНОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця,
Київ, Україна

Мета. Визначення частоти виникнення мутацій ESR1 при ER-позитивному раку молочної залози, його прогностична цінність при виборі тактики лікування.

Матеріали та методи. Систематичний огляд якісних досліджень, які було взято із баз даних PubMed і Thomas Reuters Web of Science. У дослідженні використано бібліосемантичний та аналітичний методи.

Результати та висновки. Актуальність роботи обумовлена необхідністю додаткового дослідження, щоб краще зрозуміти поширеність мутацій ESR1 на різних стадіях рецидивуючого захворювання та їх прогностичні наслідки. Основним завданням статті є визначення частоти виникнення мутацій ESR1 при ER-позитивному раку молочної залози, його прогностична цінність при виборі тактики лікування. Було виконано систематичний огляд якісних досліджень, опублікованих у період із 2007 року по 2019 рік, які було взято із баз даних PubMed і Thomas Reuters Web of Science. Пошукові терміни включали мутації ESR1, рецептор естрогену, рак молочної залози, рецидив, метастази, інгібітори ароматази, фулвестрант і тамоксифен. Були включені лише повнотекстові дослідження англійською мовою щодо розвитку мутацій ESR1 та їх результатів щодо прогресування захворювання. Відбір досліджень проводився з використанням попередньо визначених полів даних, враховуючи показники якості дослідження. Це проспективне клінічне дослідження проводиться за допомогою молекулярно-генетичного аналізу, а саме – аналізу поліморфізму генів методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Дане дослідження виконується на базі Київського міського клінічного онкологічного центру та Кафедри онкології НМУ ім. О.О. Богомольця. На основі наявних архівних зразків була зібрана ретроспективна когорта хворих на рак молочної залози з позитивним рецептором гормону (HR +), які переживають

або місцевий, або метастатичний рецидив. Усі клінічні дані були отримані з клінічних записів пацієнтів експертом-онкологом з молочної залози. Це включало вік, стадію TNM, ступінь, показники імуногістохімії для рецепторів естрогену (ER), рецепторів прогестерону (PR), рецепторів росту епідермісу 2 людини (HER2) та ліній лікування. Позитивність ER та PR визначали на основі місцевої практики патології (> 1% позитивно забарвлених клітин). У статті було продемонстровано, що мутації ESR1 часто виникають під час терапії AI в умовах метастазування і можуть відігравати роль у прогресуванні метастазів. Досягнення в технології секвенування ДНК привели до більш чутливого виявлення мутацій ESR1 в клінічних зразках, і зараз є кілька досліджень із застосуванням методів секвенування та ddPCR для відстеження ESR1 та інших мутацій під час лікування та прогресування.

Ключові слова: мутації ESR1, секвенування ДНК, рецептори естрогену (ER), рецептори прогестерону (PR), гормонозалежні новоутворення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Оптимізування методів діагностики та лікування онкологічних хвороб органів грудної порожнини та молочної залози в Україні», № держ. реєстрації 0120U100871.

Вступ. Рак молочної залози (PMЗ) є найрозповсюдженішим онкологічним захворюванням серед жінок на сьогоднішній день, а отже, за рахунок частоти виникнення, має найвищу летальність серед онкологічних пацієнтів. Дане захворювання відноситься до гормонозалежних новоутворень, а залежність проявляється більш ніж у третини хворих, пухлини яких експресують рецептори статевих стероїдних гормонів – рецептори естрогену (ER) та рецептори прогестерону (PR). Найбільш розповсюдженими молекулярними різновидами PMЗ є люмінальний А та В-підтипи, що

експресують рецептори ER та PR. У таких хворих можна очікувати позитивну відповідь на проведення рутинної гормональної терапії (ГТ). Рецептор естрогену-альфа (ER α), кодований геном рецептора естрогену 1 (ESR1), експресується приблизно в 70% усіх випадків раку молочної залози, і ендокринна терапія являє собою основний спосіб лікування на всіх стадіях ER-позитивного раку молочної залози [1, 2]. Мутації в ліганд-зв'язуючому домені (LBD) ER α , що називаються мутаціями ESR1, призводять до стійкості при використанні різних ендокринних методів лікування, що в свою чергу є причиною прогресування або рецидиву захворювання. Недавні дослідження показали, що ці мутації ESR1 призводять до конститутивної активності рецептора естрогену ER, тобто це значить, що рецептор активний за відсутності його ліганду, що надає стійкість до ендокринної терапії та сприяє росту пухлини. Опубліковані дослідження ще не змогли визначити точний рівень поширеності мутацій ESR1, але встановили зовнішні межі між 11-55% [3]. Рецептор естрогену є фактором транскрипції, що бере участь у проліферації та активації клітин. Ендокринна терапія є основою лікування як місцевих, так і метастатичних пухлин HR + і включає в себе інгібування ER модуляторами ER (тобто тамоксифеном (TAM)), деградаторами ER (тобто фульвестрантом) або депривацією естрогену інгібіторами ароматази (AI). Приблизно у 40% пацієнтів, у яких діагностовано місцевий / локально-регіональний HR + рак молочної залози, які отримують ендокринну терапію, з часом є ризик рецидиву захворювання [4, 5]. Прогресія даного захворювання може себе проявляти локально-регіональними метастазами (приблизно 3–8% випадків [6–8]), так і віддаленими метастазами. Виникнення локо-регіональних рецидивів збільшує ризик розвитку віддалених метастазів і пов'язане з гіршим загальним прогнозом [9–11]. Серед різноманітних набутих механізмів ендокринної резистентності, соматичні мутації в ділянці ліганду-зв'язуючого домену гена ER (ESR1-LBD) нещодавно потрапили в центр уваги завдяки досягненням технологій секвенування наступного покоління (NGS) [12–15]. Експерименти *in vitro* продемонстрували, що мутації ESR1-LBD призводять до незалежного від лігандів конститутивно активованого ER, що в свою чергу призводить до проліферації та зниження чутливості до ендокринної терапії [12, 13, 15–18]. Починаючи із 2013 року, в медичних наукових виданнях накопичуються повідомлення про мутації, характерні для ESR1, що призводять до резистентності при проведенні гормональної терапії [12–15, 17, 19–31]. Ці мутації рідко визначаються (0–3%) у первинних пухлинах молочної залози [13, 17, 19, 26, 27], але порівняно

часто зустрічаються при метастатичному ураженні, стійкість до ендокринної терапії в даному випадку спостерігатиметься у 6–55% [12–15, 17, 19–27, 29, 31]. На статистику поширеності мутацій ESR1 впливає чутливість методів виявлення, а також навантаження гормональної терапії перед дослідженням. Вдосконалені методи цифрової крапельної ПЛР (ddPCR) є більш чутливими, ніж технології NGS [27, 28]. Метод ddPCR у поєднанні з високою чутливістю для виявлення цих мутацій у безклітинній ДНК (cfDNA), виділеній із плазми [27, 32], чітко зображає клінічні наслідки цих мутацій. Більша кількість мутацій ESR1 була описана серед метастатичних пацієнтів, які отримували різні лінії ендокринної терапії (20–55%), на відміну від ранніх метастатичних пацієнтів (6–7%) [13, 20], отже є підтвердженням теорії про те, що мутовані клони залишаються поза лініями лікування [31–33]. Необхідні додаткові дослідження, щоб краще зрозуміти поширеність мутацій ESR1 на різних стадіях рецидивуючого захворювання та їх прогностичні наслідки.

Мета дослідження. Основним завданням цього дослідження є визначення частоти виникнення мутацій ESR1 при ER-позитивному раку молочної залози, його прогностична цінність при виборі тактики лікування.

Матеріали та методи дослідження. Було виконано систематичний огляд якісних досліджень, опублікованих у період із 2007 року по 2019 рік, які було взято із баз даних PubMed і Thomas Reuters Web of Science. Пошукові терміни включали мутації ESR1, рецептор естрогену, рак молочної залози, рецидив, метастази, інгібітори ароматази, фульвестрант і тамоксифен. Були включені лише повнотекстові дослідження англійською мовою щодо розвитку мутацій ESR1 та їх результатів щодо прогресування захворювання. Відбір досліджень проводився з використанням попередньо визначених полів даних, враховуючи показники якості дослідження.

У дослідженні використано бібліосемантичний та аналітичний методи.

Результати дослідження.

Біологія мутацій ESR1 в доклінічних дослідженнях

Деякі дослідження показали, що мутації ESR1 LBD є конститутивно активними та менш чутливими до антагоністів ER, тамоксифену та фульвестранту [17–23]. Дослідження *in vitro* показали, що мутації Y537S та D538G потребують більш високих концентрацій антагоніста для зниження сигналізації ER порівняно з диким -варіантом (WT) рецептору. Молекулярне моделювання мутацій Y537S і D538G ESR1 LBD показало, що ці мутації знаходяться в конформації апо-рецептора

і є конститутивно активними, навіть при зв'язуванні антагоніста. Це може бути одним з потенційних механізмів їхньої ліганд-незалежної активності та стійкості до ЕТ. За відсутності ліганду, мутантні рецептори виявляли підвищений водневий зв'язок між Y537S та N348, що було подібним до рецептора WT, зв'язаного з естрогеном. Мутантні рецептори також мали підвищену стабільність білка порівняно з рецептором WT при зв'язуванні з фулвестрантом. Кілька досліджень показали, що найпоширеніші мутації ESR1 LBD також залучали коактиватори, такі як SRC-1 і SRC-3, за відсутності ліганду, який додатково потенціював транскрипцію ER [18–23]. Тому було зроблено висновок, що змінена структура ESR1 мутації надавали стійкості до ЕТ і посилювали різні механізми резистентності за рахунок посиленого залучення коактиваторів.

Транскриптоми WT і мутантних ER були описані кількома групами, що показує, що існують спільні класичні сигнальні сигнатури ER, а також специфічна для мутантів регуляція транскрипції [22–24]. Використання одержаних *in vitro* моделей мутантних клітинних ліній ESR1, створених за допомогою CRISPR/Cas9 або за допомогою природного відбору клітин у станах з нестачею гормонів показало, що існує велике перекриття між сайтами зв'язування хроматину ER естроген-стимульованих рецепторів WT та мутантних рецепторів, позбавлених гормонів [25]. Крім того, вони показали, що лікування естрогеном як моделей WT, так і Y537S показало 74% узгодженість у сайтах зв'язування ER. Ці результати свідчать про те, що існують гормонозалежні, але також незалежні механізми регуляції мутантних генів і що унікальні конститутивні специфічні для мутантів ER-зв'язувальні сайти та регуляцію транскрипції слід вивчати далі, щоб краще зрозуміти роль мутанта ESR1 у зростанні та прогресуванні пухлини.

Недавні дослідження [22] продемонстрували, що моделі, які експресують мутацію Y537S, були відносно більш стійкими до інгібування росту при лікуванні тамоксифеном або фулвестрантом порівняно з D538G і WT, що узгоджується з багатьма опублікованими дослідженнями. Мутації Y537S і D538G демонстрували різні цистроми та транскриптоми порівняно з WT ESR1. Зокрема, аналізи експресії генів, які порівнюють естроген-зв'язаний рецептор WT з мутантними рецепторами Y537S і D538G, які позбавлені гормонів, показали незначне перекриття спільної експресії генів (18% і 33% відповідно). Крім того, спостерігалось мінімальне підвищення експресії генів, коли мутантні клітини Y537S обробляли естрогеном (12 генів), але спостерігалось значне збільшення експресії генів, коли клітини, що експресують мутант D538G, обробляли естрогеном (416 генів), і багато з них гени

були унікальними для кожної мутації. Аналіз транскриптомів пухлин пацієнтів з MBC, що містять мутації ESR1, показав високу кореляцію з профілями, отриманими з цих моделей клітинних ліній, проаналізованих за допомогою аналізу збагачення набору генів, що підтверджує важливість моделей, отриманих *in vitro*. У сукупності ці дані демонструють, що мутації ESR1 опосередковують унікальні та алель-специфічні транскрипційні програми, які не просто імітують експресію WT ER, регульовану естрогеном. Краще механістичне розуміння того, як мутантні рецептори стимулюють експресію унікальних генів при метастазуванні хвороби, може дати уявлення не тільки про субклональну еволюцію мутантів ESR1, але також може визначити нові стратегії для таргетування на прогресування пухлини.

Інші дослідження розширили клінічні дані про набуті мутації ESR1 у пацієнтів з гормонально-диференційованим метастатичним раком молочної залози (MBC), підтвердивши ці спостереження в двовимірних системах культури. Наприклад, [25] були першими, хто змодельював *in vitro* природне набуття мутацій ESR1 в ER-позитивних клітинах раку молочної залози за допомогою WT ESR1 протягом тривалого періоду в середовищах, збіднених гормонами, призвело до поступового набуття мутації Y537C в клітинах MCF-7 і мутації Y537S в клітинах SUM44. Цікаво, що аналіз батьківських клітин з кожної лінії продемонстрував, що субпопуляція мутантних клітин Y537S раніше існувала в клітинах SUM44 на дуже низькій частоті, і що ця популяція потім була збагачена довгостроковими умовами *in vitro*, позбавленими естрогену. Мутація Y537C не була ідентифікована в батьківських клітинах MCF-7, що свідчить про те, що ці мутації можуть або існувати раніше, або бути придбаними залежно від фону клітинної лінії.

Крім того, стійкі до тамоксифену або фулвестранту клітинні лінії, які тривало досліджувались, не зазнали мутацій ESR1, що додатково підтверджує клінічні докази того, що більшість пухлин, які отримали мутації ESR1, під час відміни естрогену за допомогою Als. Інтегрований транскриптомний і цистромічний аналізи продемонстрували, що моделі клітинної лінії з природними мутаціями ESR1 демонструють збагачене зв'язування хроматину, що корелює з посиленою естроген-незалежною транскрипційною активністю. Ці результати в довгострокових моделях, позбавлених естрогену, також підтверджують дослідження, в яких використовувалися моделі мутації CRISPR/Cas9 або лентивірусні інженерні моделі мутації ESR1 [22, 25].

Також описані негеномні функції мутацій ESR1 [27] показали, що передача сигналів рецептора

фактора росту інсуліну 1 (IGF-1R) посилюється в моделях надмірної експресії мутантів ESR1 і бере участь у резистентності ЕТ до тамоксифену. Цікаво, що цей механізм резистентності був специфічним для клітинного типу і залежав від експресії регуляторів PI3K, PI3K3R1 і PI3K3R3, оскільки невеликий нокдаун інтерферуючої РНК цих регуляторів відновлював чутливість до тамоксифену. Лікування специфічними інгібіторами IGF-1R також викликало сенсibiлізацію мутантних клітин ESR1 до тамоксифену. Крім того, аналізи імунопреципітації ER та лігування продемонстрували посилену спільну локалізацію та перехресні перешкоди між мутантним ER та IGF-1R. Нещодавно дослідження [26] підтвердили роль шляху IGF-1R, використовуючи подібні мутантні моделі. Аналіз RNA-Seq показав підвищену сигнатуру гена IGF у мутантних моделях порівняно з моделями, що експресують рецептор WT. Ці клітини продемонстрували посилену реакцію росту на IGF1, що було загальним між мутантними моделями, а також між резистентними до тамоксифену та довгостроковими моделями, позбавленими естрогену. Націлювання на шлях IGF-1R через невеликий нокдаун РНК, або ж цільові інгібітори сенсibiлізували мутантні клітини ESR1 до ЕТ, як продемонстровано в дослідженні [27]. На жаль, інгібітори IGF-1R ще не виявилися клінічно корисними при МБС; тому наразі вони не є життєздатним цільовим клінічним підходом для пацієнтів з мутаціями ESR1. Інші рецептори фактора росту, включаючи членів сімейства HER1-3, необхідно оцінити як потенційні механізми стійкості до ЕТ в моделях мутації ESR1, оскільки було показано, що експресія різних членів сімейства рецепторів фактора росту в цих моделях посилюється [16-24].

Науковці [25] виконали швидко імунопреципітацію за допомогою тандемної мас-спектрометрії ендогенних білків, щоб окреслити ESR1 WT та мутантні інтерактоми. Ці аналізи продемонстрували, що багато білків, зв'язаних мутантним ESR1, також зв'язувалися з WT ESR1, але спостерігалися підвищені взаємодії між мутантними рецепторами та вибраними регуляторами транскрипції, такими як GREB1 і FOXA1. Аналіз ChIP-Seq також продемонстрував ліганд-незалежне збагачення мотивів FOXA1 у мутантних клітинах ESR1. Цілеспрямований нокдаун FOXA1 в WT і мутантних клітинах призвів до більшого пригнічення росту мутантних клітин ESR1 порівняно з WT, що свідчить про роль FOXA1 в мутант-специфічній біології. Навпаки, дослідники [22] виявили, що мотив FOXA1 не був збагаченим у клітинах Y537S, позбавлених гормонів, порівняно з клітинами WT, обробленими естрогеном, і що нокдаун FOXA1 дійсно вплинув на ріст мутантних клітин ESR1 порівняно з клітинами WT.

Ці суперечливі висновки можна пояснити різними умовами лікування між групами, різним моделюванням мутацій ESR1 за допомогою CRISPR/Cas9 або систем надмірної експресії, або різним клітинним фоном. Дослідження інтерактому мутантного ESR1 із клінічних зразків потребує більш ретельного вивчення, оскільки вони можуть допомогти усунути ці розбіжності та потенційно визначити нові підходи для націлювання на прямі, специфічні для мутантів регулятори транскрипції у мутантних зразках ESR1.

Вплив мутацій ESR1 на метастазування та прогресування пухлини

Існують значні доклінічні та клінічні дані, які демонструють, що метастатичні пухлинні клітини з мутаціями ESR1 найчастіше отримуються під впливом селективного тиску терапії інгібіторами ароматази (AI) [22, 27]. Ці мутації рідкісні або відсутні в первинних пухлинах. Мутантні клітини ESR1 можуть демонструвати посилений «агресивний фенотип», що може забезпечити збагачення субклональних клітинних популяцій в циркулюючих пухлинних клітинах і в місцях метастазування [28, 29].

Транскрипційне профілювання з цього та інших досліджень показало, що мутації ESR1 сприяють посиленню регуляції характерних шляхів раку, включаючи відповідь на естроген, шлях p53 і передачу сигналів MTOC1, що свідчить про роль мутантних ER у стимулюванні ЕТ-резистентного та метастатичного фенотипу [22, 25].

Чутливі методи виявлення мутацій ESR1 в клінічних біоптатах

Було обґрунтовано, що виявлення мутацій ESR1 у клінічних зразках може надати важливу прогностичну інформацію щодо курсу лікування ER-позитивного метастатичного захворювання. Пацієнтки з ER-позитивним раком молочної залози можуть рецидивувати через багато років після завершення допоміжної терапії. Через п'ятнадцять років після цього фундаментального відкриття багато лабораторій підтвердили наявність мутацій ESR1 у зразках біопсії МБС за допомогою глибокого секвенування, і разом ці дослідження виявили гарячу точку для мутацій ESR1 в області LBD за допомогою різних методів секвенування ДНК [15-25]. Ранні дослідження з використанням секвенування наступного покоління (NGS) як методу виявлення мутацій ESR1 показали, що мутації були відносно рідкісними в клінічних зразках. Однак розвиток технології крапельної цифрової ПЛП (ddPCR) дозволив більш чутливо і надійно виявляти ці мутації. Згідно з поточними даними, вважається, що отримання мутацій ESR1 є найпоширенішим механізмом стійкості до ЕТ у МБС. Однією з проблем при раку молочної залози

є розробка прогностичних біомаркерів для моніторингу пацієнтів з МБС. Далі обговорюються різні підходи до секвенування, які нещодавно були розроблені з використанням ретроспективного аналізу зразків клінічних випробувань для оцінки появи мутацій ESR1 під час прогресування пухлини.

*Доклінічні стратегії для визначення
дійових цілей при мутантному
раку молочної залози ESR1*

Повногеномний нокаутний скринінг CRISPR та транскриптомний аналіз виявили кілька генів, які є суттєвими для росту мутантних пухлин ESR1 [32]. Потенційні кандидати, визначені в цих доклінічних дослідженнях, класифікуються як корегулятори ER, кінази та рецептори, які беруть участь у передачі сигналів фактором росту та фосфорилуванні ER [27-33]. Важливо, що багато з цих білків є цільовими, а комбінації специфічних інгібіторів і ET мають або адитивне, або синергічне зниження росту в доклінічних моделях. Фармакологічне інгібування коактиватора SRC-3 у поєднанні з ET синергетично знижує транскрипційну активність ER та зростання мутантних моделей, що експресують ER. Крім того, інгібітор SRC SI-2 у поєднанні з AZD9496 значно інгібував ріст мутантної моделі PDX Y537S ESR1 *in vivo*, що свідчить про те, що сімейство коактиваторів SRC може бути корисною терапевтичною мішенню для блокування росту мутантного ER. На додаток до націлювання на корегулятори ER, кілька досліджень показали, що націлювання на кінази, які фосфорилують мутантний ER, може посилити інгібування росту ET. CDK7 фосфорилує ER на S118 і також необхідний для прогресування клітинного циклу. Селективний інгібітор CDK7 THZ1 значно зменшував ріст клітин MCF-7, що експресують мутацію Y537S ESR1. Комбінація THZ1 з фулвестрантом призвела до подальшого зниження росту, зменшення фосфорилування S118 та зниження експресії гена, опосередкованої ER. Jeselsohn R. та співавтори підтвердили ці висновки, а також повідомили, що ріст пухлин ксенотрансплантата MCF-7 ESR1 Y537S значно зменшувався при застосуванні фулвестранта в комбінації з THZ1 [30]. У дослідженні [27] повідомляється, що CDK2 може фосфорилувати ER серин 294, що призводить до ліганд-незалежної ER-опосередкованої транскрипції гена. Також було виявлено, що ER S294 гіперфосфорильований у клітинах MCF-7 ESR1 Y537S і D538G порівняно з клітинами WT ESR1. Лікування інгібітором CDK2 динациклібом призвело до зниження фосфорилування S294, а в поєднанні з тамоксифеном призводило до регресії пухлини на моделі ксенотрансплантату MCF-7 ESR1 Y537S. Ці дані демонструють, що інгібування селективних CDK, таких як CDK7 і CDK2, потенційно може принести

користь пацієнтам з мутаціями ESR1 і підтримує клінічний розвиток цих альтернативних підходів до лікування. Мутантні моделі ESR1 були використані для демонстрації інших потенційних шляхів, таких як реакція розгорнутого білка (UPR). В роботі [28], показали, що мутантні клітини Y537S і D538G мають конститутивну гіперактивацію шляху UPR, і що це може сприяти розвитку стійкого до ET фенотипу мутантних клітин ESR1 Y537S і D538G. Біомодулятор ER BHPI активує UPR, що викликає пригнічення синтезу білка і загибель клітин. Лікування T47D ESR1 WT і мутантних клітин за допомогою BHPI зменшувало зростання, стимульований естрогеном, і ще більше посилювало зниження росту тамоксифеном або фулвестрантом. Крім того, активація рецептора прогестерону прогестином була пов'язана з підвищеною стійкістю до антиестрогенної терапії та подальшою активацією шляху UPR в мутантних клітинах ESR1, що вимірюється за допомогою маркерів, що знаходяться нижче по ходу, таких як зрощений XBP1. Лікування BHPI зменшувало зростання, стимульований прогестином. У сукупності це дослідження продемонструвало, що активація UPR сприяє виникненню стійкого до ET фенотипу, пов'язаного з експресією мутації ESR1. Gelsomino L. et al. [16], продемонстрували, що мутація Y537S ESR1 збільшує фенотип, подібний до стовбурових клітин. Мутантні клітини Y537S ESR1 демонстрували більший відсоток клітин CD44+/CD24- порівняно з клітинами WT ESR1 і мали посилену передачу сигналів Notch, що вказує на те, що ці клітини є більш схожими на стовбур. Терапевтичний скринінг інгібіторів шляху стовбурових клітин посилив передачу сигналів Notch у мутантних клітинах ESR1, яка була опосередкована через фосфорилування залишку S118 в Y537S ER. Крім того, інгібування передачі сигналів Notch за допомогою селективного інгібітора RO4929097 знижувало ефективність утворення мамосфери, але інгібітори інших шляхів стовбурових клітин, таких як Wnt/β-катенеїн, були неефективними. Ці колективні результати показують, що мутантні клітини ESR1 мають збагачені властивості стовбурових клітин завдяки передачі сигналів Notch і що цей шлях потенційно може бути спрямований у пацієнтів з пухлинами, що експресують мутантний ESR1.

Додатковою новою стратегією подолання резистентності до ET є терапевтичне націлення на білки, що модифікують епігенетику, або для інгібування транскрипційної активності ER, або для ресенсибілізації пухлинних клітин до ET шляхом модифікації експресії ER та зв'язування хроматину. Інгібітор JQ1 націлений на сімейство білків бромодомену BET, а інгібітор HDAC вориностат був випробуваний на моделі ESR1 D538G і продемонстрував ефективне зниження росту пухлини та

транскрипційної активності ER при лікуванні в комбінації з фулвестрантом [27]. На жаль, інгібітори BET показали широко розповсюджену токсичність у клінічних дослідженнях. Ефективність інгібітора HDAC ентіностата була перевірена в клінічних дослідженнях у комбінації з ET. У дослідженні 2 фази ENCORE301 пацієнти з ER-позитивним поширеним раком молочної залози отримували лікування екземестаном або в комбінації з ентіностатом [31, 32]. Відбулося покращення показників PFS (4,3 проти 2,3 місяця) і OS (28,1 проти 19,8 місяців) з комбінацією, що призвело до початку більшого дослідження фази 3 E2112 (NCT02115282) [33]. Оскільки доклінічні дослідження показують, що мутантні клітини ESR1 чутливі до інгібування HDAC у поєднанні з ET, було б цінно дізнатися, чи проводять клінічні випробування тамоксифену чи фулвестранту, й чи отримують пацієнти з мутаціями ESR1 користь від цих комбінацій. Ці дослідження демонструють, що існує кілька нових цілей, які потенційно можуть бути застосовними в клініці; однак існує нагальна потреба продовжити розробку клінічних випробувань інгібіторів цих нових мішеней.

Додатковим фактором для розробки ефективних методів лікування мутантних пухлин ESR1 буде націлювання на загальні набуті механізми резистентності між мутантом і WT ER. Більшість пацієнтів із прогресуючим або ER-позитивним MBC будуть лікуватися інгібітором CDK4/6 або mTOR у поєднанні з ET протягом перебігу захворювання. Справді, зараз кілька досліджень демонструють різні механізми набуті резистентності до інгібіторів mTOR або CDK4/6 при раку молочної залози та інших видів раку, включаючи посилення передачі сигналів MAPK в моделях, стійких до еверолімусу та палбоциклібу, а також мутації в RB1 та активацію CDK2, CCNE1 або PDK1 в клітинах, стійких до палбоциклібу [27-33]. Ці відхилення, пов'язані з резистентністю до таргетної терапії, можуть бути використані для розробки ефективної послідовності лікування для затримки прогресування захворювання. Безумовно, кілька останніх і поточних клінічних випробувань, де перевіряються досліджувані агенти, набирають пацієнтів, які раніше отримували інгібітори mTOR або CDK4/6, і порівняння відповіді між цими популяціями пацієнтів необхідно для того, щоб зрозуміти, чи отримують певні групи пацієнтів користь від секвенування й цільового лікування або вони за своєю природою резистентні до терапії.

Обсяг запланованого дослідження

Це проспективне клінічне дослідження проводиться за допомогою молекулярно-генетичного аналізу, а саме – аналізу поліморфізму генів методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Дане дослідження виконується на базі Київського

міського клінічного онкологічного центру та Кафедри онкології НМУ ім. О.О. Богомольця.

На основі наявних архівних зразків була зібрана ретроспективна когорта хворих на рак молочної залози з позитивним рецептором гормону (HR +), які переживають або місцевий, або метастатичний рецидив. Усі клінічні дані були отримані з клінічних записів пацієнтів експертом-онкологом з молочної залози. Це включало вік, стадію TNM, ступінь, показники імуногістохімії для рецепторів естрогену (ER), рецепторів прогестерону (PR), рецепторів росту епідермісу 2 людини (HER2) та ліній лікування. Позитивність ER та PR визначали на основі місцевої практики патології (> 1% позитивно забарвлених клітин).

Критерії включення для участі у дослідженні: жінки віком від 18 років хворі на гормоночутливий РМЗ (ER + / HER2-) , клінічна група 2-3, як у пре-, так і в постменопаузальний період, відсутність спеціального хіміотерапевтичного лікування в анамнезі. Зразки біологічного матеріалу осіб, які беруть участь в дослідженні, були отримані після одержання інформованої згоди про проведення даного дослідження. Матеріалом для дослідження слугують зразки венозної крові та пухлинний біоптат. Дві найпоширеніші мутації ESR1 (A-351G, T-397C) будуть оцінені в зібраних зразках методом ПЛР. Мутації ESR1 аналізуватимуть ДНК за допомогою цифрової ПЛР. Молекулярно-генетичне дослідження проводиться на базі Державного закладу «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України».

У цьому дослідженні метою було описати поширеність мутацій ESR1 у ранніх рецидивах, локальних рецидивах та діагностованих метастазах у порівнянні з пролікованою метастатичною хворобою. В подальшому будуть досліджені асоціації з попередніми методами лікування та клінічними результатами у кожній підгрупі. Результати попередніх досліджень демонструють, що мутації ESR1 присутні при нещодавно діагностованих метастатичних та місцевих рецидивах, і їх наявність пов'язана з виживанням. Ця робота підкреслює важливість тестування мутацій ESR1 на ранніх стадіях рецидиву, оскільки це може визначити ведення пацієнтів, включаючи спостереження та зміни в плані лікування.

Висновки та перспективи подальших досліджень. У сукупності було продемонстровано, що мутації ESR1 часто виникають під час терапії AI в умовах метастазування і можуть відігравати роль у прогресуванні метастазів. Досягнення в технології секвенування ДНК привели до більш чутливого виявлення мутацій ESR1 в клінічних зразках, і зараз є кілька досліджень із застосуванням методів секвенування та ddPCR для

відстеження ESR1 та інших мутацій під час лікування та прогресування. Цільове секвенування ДНК і технології ddPCR показали, що мутації ESR1 можуть існувати раніше приблизно в 5% первинних пухлин і значно збагачуються на 30-40% в умовах метастазування. Аналіз ctDNA дозволяє використовувати простий, неінвазивний і відносно недорогий метод моніторингу мутацій, які можуть виникнути під час лікування, який в кінцевому підсумку може бути використаний для прийняття рішень щодо лікування. Важливо, що сам по собі моніторинг мутацій ESR1 не є клінічно передбачуваним для лікування; однак моніторинг набуття стовбурових або інших мутацій може передбачити відповідь та/або прогресування лікованих онкологічних захворювань. В даний час пацієнтів, які мають пухлини, що експресують мутації ESR1, найкраще лікувати комбінацією фулвестранту та

палбоциклібу, оскільки ця комбінація значно покращила PFS у пацієнтів з більшістю ідентифікованих мутацій ESR1. Поточні клінічні випробування з використанням фулвестранту з специфічними інгібіторами PI3K-альфа показують багатообіцяючі клінічні результати, але аналіз того, чи отримають користь від цього лікування пацієнти з специфічними мутаціями ESR1, ще не опублікований. Крім того, імунотерапія стає все більш ефективною при солідних пухлинах, і є надія, що поточні клінічні випробування можуть показати клінічну користь у вибраних ER-позитивних пацієнтів з MBC. Доклінічні дослідження виявили нові цілі, які можуть бути клінічно важливими для націлювання на цих пацієнтів. Потрібні подальші відкриття та розробка цільових інгібіторів, а також необхідні поточні та майбутні клінічні випробування, щоб виявити нові варіанти лікування пацієнтів з MBC.

References

1. Najim O, Seghers S, Sergoyne L, Van Gaver H, Papadimitriou K, Wouters K, et al. The association between type of endocrine therapy and development of estrogen receptor-1 mutation(s) in patients with hormone-sensitive advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized trials. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1872(2):188-315. PMID: 31647985. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188315
2. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol*. 1984;2(10):1102-9. PMID: 6491696. doi: 10.1200/JCO.1984.2.10.1102
3. Najim O, Huizing M, Papadimitriou K, Trinh XB, Pauwels P, Goethals S, et al. The prevalence of estrogen receptor-1 mutation in advanced breast cancer: The estrogen receptor one study (EROS1). *Cancer Treat Res Commun*. 2019;19:100123. PMID: 30826563. doi: 10.1016/j.ctarc.2019.100123
4. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9;377(19):1836-1846. PMID: 29117498. PMID: PMC5734609. doi: 10.1056/NEJMoa1701830
5. Richman J. Beyond 5 years: enduring risk of recurrence in oestrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 May;16(5):296-311. PMID: 30563978. doi: 10.1038/s41571-018-0145-5
6. Buchanan CL, Dorn PL, Fey J, Giron G, Naik A, Mendez J, et al. Locoregional recurrence after mastectomy: incidence and outcomes. *J Am Coll Surg*. 2006 Oct;203(4):469-74. PMID: 17000389. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2006.06.015
7. McGuire A, Lowery AJ, Kell MR, Kerin MJ, Sweeney KJ. Locoregional recurrence following breast cancer surgery in the trastuzumab era: a systematic review by subtype. *Ann Surg Oncol*. 2017 Oct;24(11):3124-3132. PMID: 28755141. doi: 10.1245/s10434-017-6021-1
8. Christiansen P, Al-Suliman N, Bjerre K, Møller S; Danish Breast Cancer Cooperative Group. Recurrence pattern and prognosis in low-risk breast cancer patients--data from the DBCG 89-A programme. *Acta Oncol*. 2008;47(4):691-703. PMID: 18465337. doi: 10.1080/02841860802056594
9. Neuman HB, Schumacher JR, Francescatti AB, Adesoye T, Edge SB, Vanness DJ. Risk of synchronous distant recurrence at time of locoregional recurrence in patients with stage II and III breast cancer (AFT-01). *J Clin Oncol*. 2018;36:975-980. PMID: 29384721. PMID: PMC5877801. doi: 10.1200/JCO.2017.75.5389
10. Anderson SJ, Wapnir I, Dignam JJ, Fisher B, Mamounas EP, Jeong J-H. Prognosis after ipsilateral breast tumor recurrence and locoregional recurrences in patients treated by breast-conserving therapy in five National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocols of node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:2466-2473. PMID: 19349544. PMID: PMC2684852. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8424
11. van Tienhoven G, Voogd AC, Peterse JL, Nielsen M, Andersen KW, Mignolet F, et al. EORTC Breast Cancer Cooperative Group and the Danish Breast Cancer Cooperative Group Prognosis after treatment for loco-regional recurrence after mastectomy or breast conserving therapy in two randomised trials (EORTC 10801 and DBCG-82TM). *Eur J Cancer*. 1999 Jan;35(1):32-8. PMID: 10211085. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00301-3

12. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, et al. D538G mutation in estrogen receptor- α : a novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 2013 Dec 1;73(23):6856-64. PMID: 24217577. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1197
13. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Apr 1;20(7):1757-1767. PMID: 24398047. PMCID: PMC3998833. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2332
14. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1439-45. PMID: 24185512. PMCID: PMC3903423. doi: 10.1038/ng.2822
15. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1446-51. PMID: 24185510. PMCID: PMC4009946. doi: 10.1038/ng.2823
16. Gelsomino L, Gu G, Rechoum Y, Beyer AR, Pejerrey SM, Tsimelzon A, et al. ESR1 mutations affect anti-proliferative responses to tamoxifen through enhanced cross-talk with IGF signaling. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Jun;157(2):253-265. PMID: 27178332. PMCID: PMC5510243. doi: 10.1007/s10549-016-3829-5
17. Toy W, Weir H, Razavi P, Lawson M, Goepfert AU, Mazzola AM, et al. Activating ESR1 mutations differentially affect the efficacy of ER antagonists. *Cancer Discov.* 2017 Mar;7(3):277-287. PMID: 27986707. PMCID: PMC5340622. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1523
18. Zhang QX, Borg A, Wolf DM, Oesterreich S, Fuqua SA. An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 1997 Apr 1;57(7):1244-9. PMID: 9102207.
19. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of ESR1 mutations in 325 breast cancer specimens. *Transl Res.* 2015 Dec;166(6):540-553. PMID: 26434753. doi: 10.1016/j.trsl.2015.09.003
20. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7:313. PMCID: PMC4998737. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7551
21. Niu J, Andres G, Kramer K, Kundranda MN, Alvarez RH, Klimant E, et al. Incidence and clinical significance of ESR1 mutations in heavily pretreated metastatic breast cancer patients. *Onco Targets Ther.* 2015 Nov 11;8:3323-8. PMID: 26648736. PMCID: PMC4648593. doi: 10.2147/OTT.S92443
22. Chandarlapaty S, Chen D, He W, Sung P, Samoila A, You D, et al. Prevalence of ESR1 mutations in cell-free DNA and outcomes in metastatic breast cancer: a secondary analysis of the BOLERO-2 clinical trial. *JAMA Oncol.* 2016 Oct 1;2(10):1310-1315. PMID: 27532364. PMCID: PMC5063698. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1279
23. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2016 Sep 1;34(25):2961-8. PMID: 27269946. doi: 10.1200/JCO.2016.67.3061
24. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, Beaussire L, Delacour J, Calbrix C, et al. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget.* 2016 Nov 15;7(46):74448-74459. PMID: 27801670. PMCID: PMC5342678. doi: 10.18632/oncotarget.12950
25. Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, et al. Mutational profile of metastatic breast cancers: a retrospective analysis. *PLoS Med.* 2016 Dec 27;13(12):e1002201. PMID: 28027327. PMCID: PMC5189935. doi: 10.1371/journal.pmed.1002201
26. Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R, Lucas PC, Hartmaier RJ, Watters RJ, et al. Sensitive detection of mono- and polyclonal ESR1 mutations in primary tumors, metastatic lesions, and cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2016 Mar 1;22(5):1130-7. PMID: 26500237. PMCID: PMC4775406. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1534
27. O'Leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The genetic landscape and clonal evolution of breast cancer resistance to palbociclib plus fulvestrant in the PALOMA-3 trial. *Cancer Discov.* 2018 Nov;8(11):1390-1403. PMID: 30206110. PMCID: PMC6368247. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0264
28. Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, et al. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):145-153. PMID: 29045530. PMCID: PMC6264798. doi: 10.1093/annonc/mdx483
29. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, et al. Comparison of ESR1 mutations in tumor tissue and matched plasma samples from metastatic breast cancer patients. *Transl Oncol.* 2017 Oct;10(5):766-771. PMID: 28778025. PMCID: PMC5538967. doi: 10.1016/j.tranon.2017.07.004

30. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Oct;12(10):573-83. PMID: 26122181. PMCID: PMC4911210. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.117
31. Fuqua S, Gu G, Rechoum Y. Estrogen receptor (ER) alpha mutations in breast cancer: hidden in plain sight. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Feb;144(1):11-9. PMID: 24487689. PMCID: PMC4123761. doi: 10.1007/s10549-014-2847-4
32. Malorni L, Piazza S, Ciani Y, Guarducci C, Bonechi M, Biagioni C, et al. A gene expression signature of retinoblastoma loss-of-function is a predictive biomarker of resistance to palbociclib in breast cancer cell lines and is prognostic in patients with ER positive early breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(42):68012-68022. PMID: 27634906. PMCID: PMC5356535. doi: 10.18632/oncotarget.12010
33. Min A, Kim JE, Kim YJ, Lim JM, Kim S, Kim JW, et al. Cyclin E overexpression confers resistance to the CDK4/6 specific inhibitor palbociclib in gastric cancer cells. *Cancer Lett*. 2018 Aug 28;430:123-132. PMID: 29729292. doi: 10.1016/j.canlet.2018.04.037

UDC 618.19–006.6–02–092–07–037

ESR1 Mutations as a Predictor of Progression and Metastasis of Hormone-Dependent Breast Cancer

Zakharchuk S. V.

Abstract. The relevance of the work is due to the need for additional research to better understand the prevalence of ESR1 mutations at different stages of recurrent disease and their prognostic implications.

The purpose of the study was to determine the incidence of ESR1 mutations in ER-positive breast cancer, its prognostic value in the choice of treatment.

Materials and methods. A systematic review of quality studies, which were taken from PubMed and Thomas Reuters Web of Science databases, published between 2007 and 2019 was performed. Search terms included ESR1 mutations, estrogen receptor, breast cancer, recurrence, metastasis, aromatase inhibitors, fulvestrant and tamoxifen. Only full-text studies in English on the development of ESR1 mutations and their outcomes on disease progression were included. Studies were selected using predefined data fields, taking into account the quality of the study. This prospective clinical study is conducted by means of molecular genetic analysis, namely, gene polymorphism analysis by polymerase chain reaction. This study is carried out on the basis of the Kyiv City Clinical Oncology Center and the Department of Oncology of the Bogomolets National Medical University. A retrospective cohort of hormone receptor positive breast cancer patients experiencing either local or metastatic recurrence was collected from available archival specimens. All clinical data were obtained from the patients' clinical records by an expert breast oncologist. This included age, TNM stage, grade, immunohistochemistry scores for estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, and treatment lines.

Results and discussion. Estrogen receptor and progesterone receptor positivity was determined based on local pathology practice (> 1% positively stained cells). The article demonstrated that ESR1 mutations often occur during AI therapy in the setting of metastasis and may play a role in metastasis progression. Advances in DNA sequencing technology have led to more sensitive detection of ESR1 mutations in clinical samples, and there are now several studies using sequencing and ddPCR techniques to track ESR1 and other mutations during treatment and progression. Targeted DNA sequencing and ddPCR technologies have shown that ESR1 mutations may pre-exist in approximately 5% of primary tumors and are significantly enriched by 30-40% in the setting of metastasis. The ctDNA analysis provides a simple, non-invasive and relatively inexpensive method for monitoring mutations that may arise during treatment, which can ultimately be used to guide treatment decisions.

Conclusion. Importantly, ESR1 mutation monitoring alone is not clinically predictive of treatment; however, monitoring the acquisition of stem cell or other mutations may predict response and/or progression of treated cancers. Currently, patients with tumors expressing ESR1 mutations are best treated with the combination of fulvestrant and palbociclib, as this combination has significantly improved PFS in patients with most identified ESR1 mutations. Ongoing clinical trials using fulvestrant with specific PI3K-alpha inhibitors are showing promising clinical results, but analysis of whether patients with specific ESR1 mutations will benefit from this treatment has not yet been published.

Keywords: ESR1-mutations, DNA sequencing, estrogen receptors, progesterone receptors, hormone-dependent neoplasms.

ORCID and contributionship:

Sofia V. Zakharchuk : 0000-0002-6426-0130 ^{A,B,D,E,F}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Sofia V. Zakharchuk

Bogomolets National Medical University,
Department of Oncology
69, Verkhovynna Str., Kyiv 03115, Ukraine
tel: +380444508232, e-mail: zakharchuk.sv@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 29.10.2022 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування