

УДК 577.2

МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПУТЕЙ СВЯЗАНЫ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ТЕРАПИИ ТРАСТУЗУМАБОМ ПРИ HER2-ПОЗИТИВНОМ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛУЧШЕ, ЧЕМ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ*

© 2020 М. Сорокин^{1,2,3}, К. Игнатъев⁴, В. Барбара⁴, У. Владимиров^{1,3}, А. Муравьева³, М. Сунцова¹, Н. Гайфуллин⁵, И. Воротников⁶, Д. Камашев^{1,3}, А. Бондаренко⁷, М. Баранова^{7,8}, Е. Поддубская^{3,7}, А. Буздин^{1,2,3,9**}

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: buzdin@oncobox.com

² OmicsWay Corp., 91789 Walnut, CA, США

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991 Москва, Россия

⁴ ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер», 185016 Петрозаводск, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

⁶ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия

⁷ Многопрофильный медицинский центр «ВитаМед», 121309 Москва, Россия

⁸ ФГБНУ «Российский Научный Центр Хирургии им. акад. Б.В. Петровского», 119991 Москва, Россия

⁹ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 31.03.2020

После доработки 29.05.2020

Принята к публикации 31.05.2020

Повышенная экспрессия или амплификация гена *ERBB2*, кодирующего тирозинкиназу HER2, — хорошо известный и широко используемый прогностический биомаркер назначения таргетного противоопухолевого препарата трастузумаб и его аналогов при раке молочной железы (РМЖ). Поскольку часть опухолей с повышенной экспрессией HER2 все же не отвечает на трастузумаб, мы провели клиническое исследование NCT03521245 для выявления дополнительных экспрессионных биомаркеров трастузумаба при HER2-позитивных РМЖ. С помощью РНК-секвенирования мы профилировали генную экспрессию для 23-х образцов фиксированной в формалине парафинизированной ткани HER2-позитивного РМЖ, полученных от пациентов с известным статусом ответа на трастузумаб. Для групп пациентов-ответчиков и неответчиков на лечение мы обнаружили ряд дифференциально регулируемых генов и молекулярных путей. Мы сравнили эти результаты с 42-мя профилями РНК-секвенирования пациентов-ответчиков и неответчиков на терапию трастузумабом, ранее опубликованными по итогам клинических исследований NCT00513292 и NCT00353483. Мы не нашли корреляции между статусом ответа и уровнем экспрессии самого гена *ERBB2* в HER2-положительных образцах РМЖ. Сравнение дифференциально регулируемых генов и молекулярных путей в объединенном наборе данных выявило 15 активированных и 27 подавленных у ответчиков на трастузумаб генов и 15/25 молекулярных путей соответственно. Тем не менее по сравнению с моделью случайного распределения статистически значимым оказалось только пересечение молекулярных путей, активированных у ответчиков по сравнению с неответчиками. Классификатор, построенный нами на основе наиболее сильно активированного дифференциального молекулярного пути «сAMP Pathway Protein Retention», показал наилучшую эффективность для прогнозирования ответа на трастузумаб HER2-положительного РМЖ как для наших, так и для ранее опубликованных данных. Этот путь также статистически достоверно ($p = 0,041$) предсказывал время до рецидивирования заболевания в комбинированном наборе данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак молочной железы, HER2, *ERBB2*, транскриптомика, РНК-секвенирование, трастузумаб, таргетная терапия, персонализированная медицина, NCT03521245.

DOI: 10.31857/S0320972520070040

Принятые сокращения: РМЖ — рак молочной железы, PR — прогестероновый рецептор, AUC — площадь под ROC-кривой, УАП — уровень активации пути, ER — эстрогеновый рецептор.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-089, 24.06.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

На исследования и лечение рака молочной железы (РМЖ) сильно повлияло открытие таких мощных прогностических биомаркеров, как сверхэкспрессия или амплификация тирозинкиназы HER2, экспрессия эстрогенового (ER) и прогестеронового (PR) рецепторов. Злокачественные опухоли молочной железы, где отсутствует значительная экспрессия ER и PR, с базальным уровнем HER2 классифицируют как тройной отрицательный РМЖ. При РМЖ амплификация *ERBB2* и повышенная экспрессия кодируемого им белка HER2 наблюдаются в 15–35% случаев [1–3]. Амплификация *ERBB2* и избыточная экспрессия HER2, называемая «HER2-положительным» фенотипом опухоли, хорошо коррелирует с ответом пациента на лечение трастузумабом – HER2-специфичным моноклональным антителом, применяемым для таргетной терапии РМЖ и рака желудка [4]. Для HER2-положительных онкологических заболеваний таргетная терапия трастузумабом обычно рекомендуется независимо от статуса ER и PR, что привело к значительному увеличению выживаемости больных в последние годы. HER2-таргетная терапия часто сочетается со стандартными режимами химиотерапии или с гормональной терапией. И наоборот, подавляющее большинство HER2-отрицательных опухолей оказываются нечувствительны к HER2-таргетным препаратам [5, 6].

Тем не менее клиническая практика показывает, что только 25–80% женщин с HER2-положительным РМЖ (согласно иммуногистохимическим тестам и/или гибридизации *in situ*) отвечают на трастузумаб [7–9]. В целом, уровень ответа оказывается выше, когда трастузумаб используется в сочетании с химиотерапией или другими таргетными препаратами, и ниже – в случае метастатического рака [10].

Следовательно, поиск дополнительных молекулярных биомаркеров, связанных с ответом на трастузумаб при HER2-положительном РМЖ, представляет большой фундаментальный и практический интерес. Молекулярные биомаркеры могут включать диагностически значимые мутации или уровни генной экспрессии на уровне мРНК или белка [11]. Кроме того, биомаркерами нового поколения могут служить уровни активации молекулярных путей, рассчитанные на основе профилей генной экспрессии [5, 12, 13]. Они показывают большую диагностическую значимость, чем уровни экспрессии единичных генов или наличие отдельных мутаций [14–17].

Данное преимущество молекулярных путей в качестве биомаркеров обусловлено их фунда-

ментальным свойством объединения экспрессии отдельных генов в результирующий показатель, называемый уровнем активации пути (УАП). Объединение генных продуктов по функциональному признаку в молекулярные пути позволяет использовать УАП вместо уровней экспрессии отдельных генов [5, 18]. Для многих видов рака было показано, что использование УАП вместо уровней отдельных генов позволяет нивелировать артефакты измерения генной экспрессии за счет уменьшения значимости технических ошибок основных экспериментальных платформ [19, 20]. Значения активации молекулярных путей могут быть преобразованы в клинически действенную оценку индивидуального ответа опухоли на таргетную терапию, например моноклональными антителами [21] или ингибиторами тирозинкиназ [22–24].

Для поиска дополнительных биологических маркеров ответа на трастузумаб при HER2-положительном метастатическом РМЖ мы инициировали клиническое исследование NCT03521245, нацеленное на измерение экспрессии генов и УАП в раковых тканях ответчиков и неответчиков на терапию. Для определения генной экспрессии мы использовали метод РНК-секвенирования, считающийся в настоящее время золотым стандартом транскриптомики [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал исследования. Иммуногистохимическая диагностика образцов РМЖ (HER2, PR, ER) была выполнена в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск, Россия) с использованием наборов антител («Roche Diagnostics», США). Для интерпретации статуса HER2 была использована следующая шкала: (i) базовое окрашивание (0), (ii) «+» (1), (iii) «++» (2) и (iv) «+++» (3). Результаты «++» и «+++» были подтверждены с помощью набора «ISH DNA Probe Cocktail» («Roche Diagnostics», США). При оценке рецепторного статуса стероидных гормонов (PR и ER) была использована шкала от 0 до 8.

Биоматериал был получен от 23-х женщин с HER2-положительным РМЖ, средний возраст которых составил 53,3 г. (диапазон 33–77 лет). Пациентки получали монотерапию трастузумабом или трастузумаб в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами: доцетаксел, или паклитаксел + карбоплатин, или паклитаксел, или доцетаксел + карбоплатин, или ингибитор ароматазы, или пертузумаб, или капецитабин,

или винорелбин, или гемцитабин; из них 19 пациенток получали адъювантную терапию, 4 — неоадъювантную. Более подробные клинические характеристики представлены в табл. S1 в Приложении.

Все исследованные образцы представляли собой фиксированные в формалине парафинизированные ткани РМЖ, содержание опухолевых клеток в которых превышало 70%, из них 19 образцов были получены в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск) и 4 образца — в Многопрофильном медицинском центре «ВитаМед» (Москва). 21 образец РМЖ представлял собой фрагменты первичных опухолей и 2 — метастазы в лимфатических узлах.

РНК-секвенирование было проведено для всех 23-х образцов РМЖ, однако только 9 из них соответствовали критериям включения в следующий этап работ: адъювантная терапия, отрицательный ER/PR-статус, метастазирование. Также из дальнейших анализов были исключены образцы с люминальным подтипом В (HER2-положительные, ER/PR-положительные), поскольку для него характерен лучший прогноз, чем для остальной части HER2-положительных опухолей молочной железы [25, 26].

В итоге 9 образцов, отобранных для дальнейшего анализа, были получены от женщин с HER2-положительным ER/PR-отрицательным РМЖ, средний возраст которых составлял 55,2 г. (диапазон 44–77 лет). Больные получали монотерапию трастузумабом в адъювантном режиме или трастузумаб в сочетании с другими терапевтическими средствами: доцетаксел или паклитаксел, + карбоплатин или паклитаксел или доцетаксел, + карбоплатин или капецитабин или винорелбин или гемцитабин (табл. 1). Восемь отобранных образцов были получены в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск), и один образец — в Многопрофильном медицинском центре «ВитаМед» (Москва).

Восемь образцов соответствовали первичным опухолям и один — метастазированию в лимфатический узел (BC-20). Данная проба была включена в анализ, поскольку мы стремились определить надежные биомаркеры устойчивости к трастузумабу, которые потенциально могли бы быть применимы не только для биопсий, полученных из первичного очага, но и для метастазов. Пациентов считали ответчиками на терапию, если ремиссия регистрировалась, по крайней мере, за период до 25-го месяца после биопсии включительно. Пять пациентов были классифицированы как ответчики и четыре — как неответчики на терапию.

Подготовка библиотек и РНК-секвенирование. РНК выделяли из срезов парафиновых блоков толщиной 10 мкм с использованием набора RNeasy FFPE («Qiagen», Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя. Для измерения концентрации РНК использовали наборы RNA 6000 Nano Assay («Agilent Technologies», Германия). Целостность РНК (RIN) оценивали с использованием биоанализатора Agilent 2100 («Agilent Technologies», Германия). Для удаления рибосомной РНК и конструирования библиотек использовали набор KAPA RNA Hyper («Roche Sequencing Solutions Inc», США) с деpleцией рибосомальной РНК. Для увеличения количества анализируемых образцов за один цикл секвенирования использовали лигирование адаптеров с баркодами. Концентрации и качество библиотеки измеряли с использованием набора Qubit dsDNA HS («Thermo Fisher Scientific», США) и Agilent TapeStation («Agilent Technologies», Германия). Всего было получено не менее 30 млн одноконцевых прочтений на каждый исследованный образец. РНК-секвенирование было выполнено компанией «Омикс-Лаб», Россия и Кафедрой патологии и лабораторной медицины Калифорнийского университета (Department of Pathology and Laboratory Medicine, University), США с использованием секвенатора Illumina HiSeq 3000 («Illumina, Inc.», США). Проверку качества данных проводили с помощью программного обеспечения (ПО) Illumina SAV («Illumina, Inc.», США), а демультимплексирование — с помощью ПО Illumina bcl2fastq2 v 2.17 («Illumina, Inc.», США). Данные секвенирования были депонированы в NCBI Sequencing Read Archive (SRA) с кодами доступа PRJNA565016 и PRJNA578290.

Обработка данных РНК-секвенирования. Полученные в результате РНК-секвенирования FASTQ-файлы обрабатывались с помощью ПО STAR aligner [27] в режиме «GeneCounts» с аннотацией транскриптома человека Ensembl (версия GRCh38.89). Генные идентификаторы Ensembl были преобразованы в генные символы с использованием набора данных HGNC (<https://www.genenames.org/>, версия базы данных от 13 июля 2017 г.). Всего были определены уровни экспрессии для 36 596 генов с уникальными идентификаторами HGNC. Минимальное число уникально картированных прочтений составило 1,40 млн со средним значением 7,35 млн. для 9 отобранных образцов (8,03 — для всех 23-х образцов). Дифференциальный анализ генной экспрессии был выполнен с использованием ПО DESeq2 [28]. Дифференциально экспрессированные гены у ответчиков и неответчиков на терапию использовали для дальнейшего анализа.

Таблица 1. Клинические данные 9 отобранных для эксперимента пациентов

№	Возраст	Стадия	Ответчик/ неответчик на терапию (О/НО)	Продолжи- тельность безрецидивного периода (мес.)	Продолжи- тельность ремиссии (мес.)	Схема терапии
BC-3	55	T2N1M0, IIIa	О	–	29	2 курса: доксорубин + циклофосфамид, затем 6 курсов: доцетаксел + трастузумаб; монотерапия трастузумабом (каждые 3 недели, 18 инъекций)
BC-4	58	T2N1M0, IIb	О	–	33	6 курсов: паклитаксел + доксорубин; монотерапия трастузумабом (18 инъекций)
BC-7	53	T2N3M0, IIIc	НО	25	без ремиссии	3 курса: адьювантная химиотерапия, лучевая терапия; монотерапия трастузумабом
BC-14	49	T2N2M0, IIIa	О	–	27	6 курсов: доксорубин + циклофосфамид; паклитаксел (12 инъекций); монотерапия трастузумабом каждые 21 день
BC-20	51	T2N0M0, II	О	–	28	6 курсов: доцетаксел + карбоплатин + трастузумаб; монотерапия трастузумабом (каждые три недели в течение 12 мес.)
BC-21	49	T1N3M0, IIIc	НО	10	без ремиссии	2 курса: паклитаксел + доксорубин; 3 курса: паклитаксел; монотерапия трастузумабом (5 мес.)
BC-25	77	T1N1M0, IIa	НО	14	без ремиссии	6 курсов: доксорубин + циклофосфамид; паклитаксел + карбоплатин + трастузумаб; монотерапия трастузумабом
BC-27	44	T2N0M0, IIa	О	–	26	паклитаксел (12 инъекций) + трастузумаб
BC-71	61	T2N0M0	НО	13	без ремиссии	5 курсов AC (доксорубин + циклофосфамид); паклитаксел + трастузумаб; монотерапия трастузумабом

Литературные данные генной экспрессии. Данные генной экспрессии пациентов с РМЖ были получены из Базы данных генотипов и фенотипов (dbGAP), код доступа: phs001291.v1.p1 [4]. 31 случай РМЖ был изучен в исследовании Z1041 Американской коллегии хирургов-онкологов (NCT00513292), где сравнивали частоту полного патологического ответа пациентов с HER2-положительным РМЖ. В исследование были включены небеременные женщины с инвазивным РМЖ со средним возрастом 50,14 г. (диапазон 36–70 лет), которые получали неоадьювантную химиотерапию и трастузумаб. Пациенты были случайным образом разделены на

2 группы. Первая получала фторурацил 500 мг/м², эпирубицин 75 мг/м² и циклофосфамид 500 мг/м² (FEC-75) в 1-й день 21-дневного цикла для четырех циклов с последующим паклитакселом 80 мг/м² и трастузумабом 2 мг/кг (после нагрузки 4 мг/кг) один раз в неделю в течение 12 недель. Вторая группа получала паклитаксел и трастузумаб один раз в неделю в течение 12 недель, а затем – четыре цикла FEC-75 (в 1-й день каждого 21-дневного цикла) и один раз в неделю трастузумаб, в той же дозировке, что и для первой группы. Помимо пациентов из исследования Z1041, в phs001291.v1.p1 были включены также профили для 11 HER2-поло-

жительных случаев РМЖ, участвующих в исследовании Медицинской школы Вашингтонского университета (NCT00353483), получавших неoadъювантную терапию трастузумабом в сочетании с химиотерапией: трастузумаб + паклитаксел + карбоплатин, или доксорубицин + карбоплатин, затем трастузумаб + паклитаксел, или FEC-75, затем трастузумаб + паклитаксел [4].

HER2-положительный статус для всех случаев определялся иммуногистохимически и/или с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Образцы РНК выделяли из замороженных биоптатов опухоли, полученных до лечения пациентов, и секвенировали. Опубликованный набор данных (табл. S2 в Приложении) содержал профили РНК-секвенирования для 42-х пациентов, из которых 17 соответствовали критериям включения в исследование – двойной отрицательный ER и PR статус. Из них 12 пациентов продемонстрировали полный патологический ответ (ППО) после лечения, а у 5 обнаружили остаточное заболевание. Клиническая аннотация исследованного набора образцов приведена в табл. 2.

Анализ молекулярных путей. Уровни активации молекулярных путей были рассчитаны с использованием метода и аналитического ПО

Oncobox [29]. Для анализа были отобраны 1754 пути, содержащие по крайней мере 10 генных продуктов, доступные в открытых базах данных Reactome [30], NCI Pathway Interaction Database [31], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [32], HumanCyc [33], Biocarta [34] и Qiagen Pathway Central, перечисленных в табл. S3 в Приложении.

Для расчета УАП все экспериментальные профили генной экспрессии для ответчиков были нормализованы на профили неответчиков. Таким же образом были нормализованы и литературные профили генной экспрессии. Молекулярные пути были визуализированы с использованием методов визуализации путей Oncobox [16, 29, 35–37].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящем исследовании мы сравнили экспериментальные и литературные данные по дифференциальной экспрессии генов и активации молекулярных путей при РМЖ в зависимости от успешности лечения трастузумабом.

Клинические данные. В ходе клинического испытания NCT03521245 «Маркеры активации

Таблица 2. Клиническая аннотация 17-ти HER2+/ER-/PR- образцов РМЖ из литературного набора phs001291.v1.p1

№	Источник	Возраст	T-стадия	N-стадия	Гистологическая степень злокачественности	Полный патологический ответ (да/нет)	Идентификатор	Время до рецидива болезни (дни)
BRC251	Z1041	52	T2	N1	3	да	SRR6447437	1679
BRC261	Z1041	61	T2	N1	2	да	SRR6498562	1665
BRC262	Z1041	45	T4	N1	3	да	SRR6447573	1674
BRC263	Z1041	49	T3	N0	3	да	SRR6447580	1582
BRC271	Z1041	70	T4	N2	3	да	SRR6447458	1285
BRC272	Z1041	47	T2	N0	3	нет	SRR6447472	112
BRC274	Z1041	52	T3	N0	3	нет	SRR6447567	1064
BRC276	Z1041	39	T2	N0	2	да	SRR6498531	NA
BRC277	Z1041	57	T2	N0	2	да	SRR6498535	936
BRC278	Z1041	53	T3	N1	3	да	SRR6498552	874
BRC279	Z1041	61	T1	N1	3	да	SRR6498528	352
BRC280	Z1041	48	T3	N1	3	нет	SRR6498538	216
BRC284	NCT00353483	50	T2	N2	3	нет	SRR6498557	NA
BRC286	NCT00353483	47	T3	N1	3	да	SRR6447563	NA
BRC288	NCT00353483	61	T2	N1	3	нет	SRR6447558	NA
BRC290	NCT00353483	50	T3	N0	2	да	SRR6447556	NA
BRC295	Z1041	54	T2	N2	3	да	SRR6447565	1674

молекулярных путей, прогнозирующие эффективность терапии трастузумабом «HER2-положительного рака молочной железы» мы получили набор экспериментальных данных для настоящего исследования. Пациенты были жителями Северо-Западной и Центральной частей Российской Федерации, которые проходили лечение в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск) или Многопрофильном медицинском центре «ВитаМед» (Москва). Использовали следующие критерии включения: взрослые женщины с гистологически подтвержденным HER2-положительным РМЖ и доступными образцами опухоли молочной железы; пациенты, получавшие трастузумаб отдельно или в комбинации с другими схемами химиотерапии с известным ответом, согласно критериям RECIST 1.1; пациенты с РМЖ II или более поздней стадии, которые подписали информированное добровольное согласие на участие в этом клиническом исследовании. Критерием исключения являлось наличие менее 70% опухолевых клеток в доступных образцах ткани РМЖ (рис. 1). На первом этапе в исследование было включено 23 пациента, опухолевые образцы которых профилировали с помощью РНК-секвенирования (табл. S1 в Приложении). Средний возраст в группе пациентов составил 53 года. В качестве критерия ответа опухоли на терапию использовали ремиссию в течение не менее 25 мес. после биопсии. В соответствии с этим пациенты были классифицированы как отвечающие или не отвечающие (ответчики/неответчики) на лечение трастузумабом. Тем не менее мы не могли напрямую сравнивать статусы ответа на трастузумаб для всех включенных пациентов, поскольку они принадлежали к разным подтипам HER2-положительного РМЖ: люминальный В или ER-/PR- фенотип. Эти два подтипа имеют существенно различающиеся прогнозы по ответу на терапию и общую выживаемость [25, 26], что препятствует их объединению в одну группу. Для дальнейшего анализа мы отобрали группу из 9 пациентов, которые имели ER-/PR- фенотип, получали адъювантную терапию и имели метастазы: пять ответчиков и четыре неответчика. Все пациенты получали трастузумаб в различных схемах лечения. Наиболее распространенные комбинации с трастузумабом (табл. 1) включали таксаны (паклитаксел или доцетаксел, n = 7) и доксорубицин (n = 6).

В качестве данных для сравнения мы использовали ранее опубликованную коллекцию [4] из 42-х клинически аннотированных профилей РНК-секвенирования РМЖ, доступных в базе данных генотипов и фенотипов (dbGAP) с

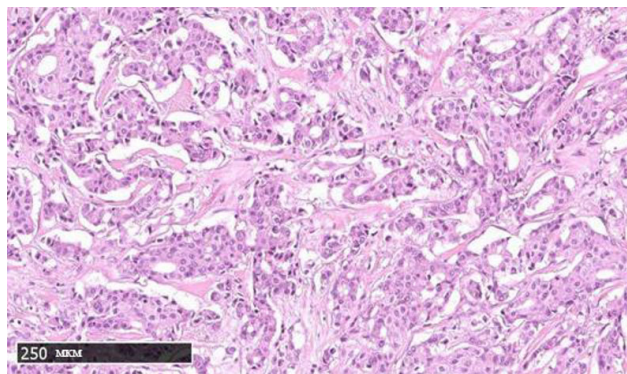


Рис. 1. Репрезентативная гистологическая микрофотография исследуемой ткани РМЖ. Показан умеренно дифференцированный инфильтрированный протоковый рак (образец BC71; HER2+/ER-/PR-). Окрашивание гематоксилином и эозином, масштабный отрезок приведен на рисунке. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

кодом доступа phs001291.v1.p1 (табл. S2 в Приложении). Из них 31 случай был описан в исследовании Американской коллегии хирургов Z1041 (NCT00513292). В этом исследовании пациенты были случайным образом распределены между двумя группами, где первая получала терапию в режиме FEC-75 (фторурацил, эпирубицин, циклофосфамид), затем паклитаксел + трастузумаб, а вторая – в режиме паклитаксел + трастузумаб, затем трастузумаб + FEC-75. Кроме того, набор phs001291.v1.p1 содержал 11 профилей HER2-положительного РМЖ, включенных в исследование Медицинского университета штата Вашингтон (NCT00353483), участники которого получали неоадъювантную терапию трастузумабом в сочетании с химиотерапией в режимах: трастузумаб + паклитаксел + карбоплатин, или доксорубицин + карбоплатин, затем трастузумаб + паклитаксел, или FEC, затем трастузумаб + паклитаксел [4]. Пациентами были женщины с инвазивным РМЖ, средний возраст группы составлял 50 лет. Для дальнейшего исследования мы отобрали образцы с ER-/PR- статусом. Пациенты также были классифицированы как ответчики (патологический полный ответ) и неответчики (остаточное заболевание). Всего для последующего анализа было отобрано 17 литературных профилей, соответствующих 12 ответчикам и пяти неответчикам на терапию (табл. 2).

Дифференциально регулируемые гены и молекулярные пути. На массивах экспериментальных и литературных данных мы отобрали гены, дифференциально экспрессируемые при РМЖ у ответчиков и неответчиков на терапию. Для экс-

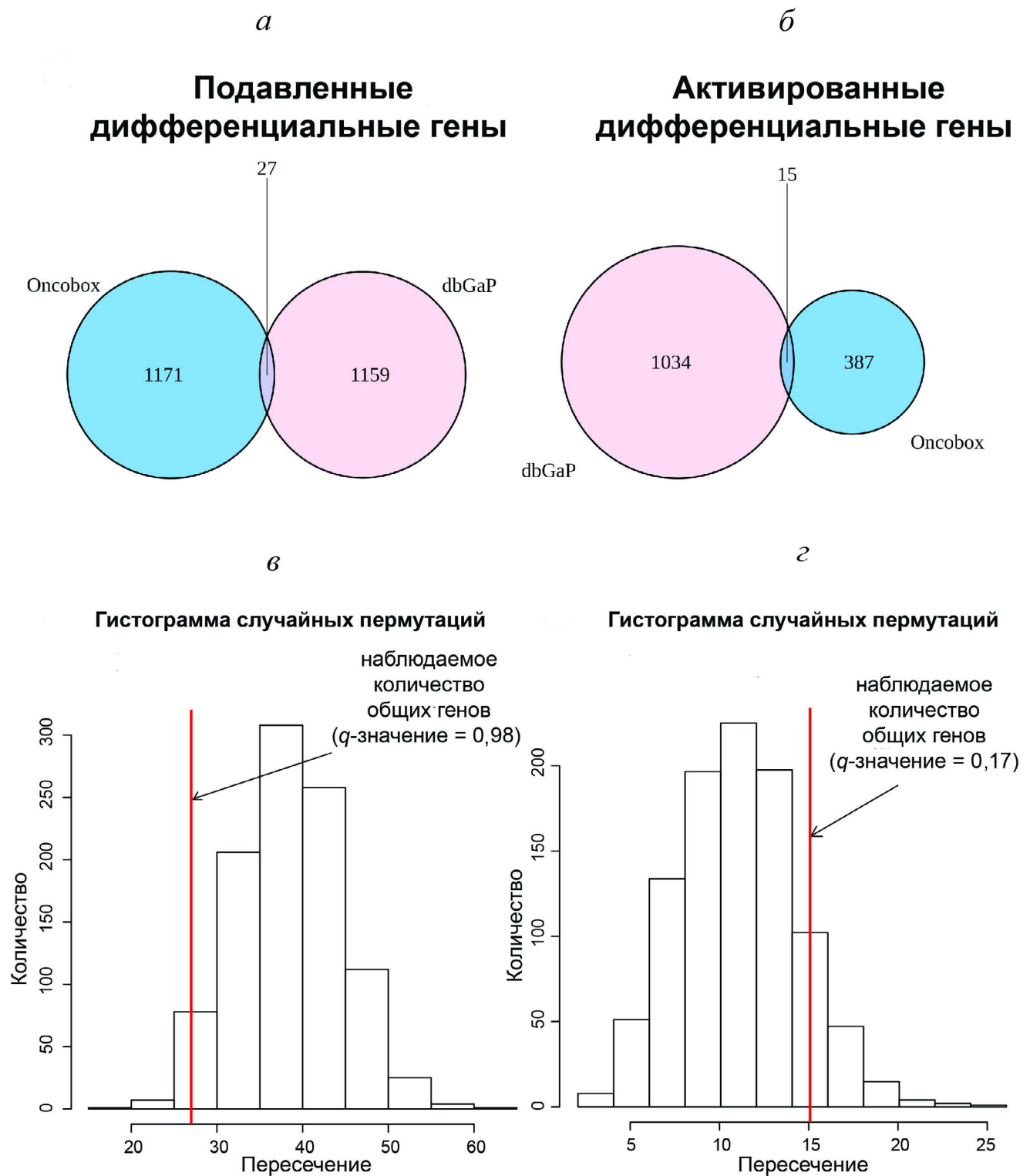


Рис. 2. Пересечение групп дифференциально экспрессируемых генов между экспериментальными и литературными наборами данных. Диаграммы Венна показывают количество дифференциально экспрессируемых подавленных (а) и активированных (б) генов между экспериментальным набором данных (NCT03521245) и литературным набором данных (dbGaP: phs001291.v1.p1). Гистограммы (в и г) показывают фактически наблюдаемое, а также теоретически ожидаемое количество дифференциально регулируемых генов исходя из модели случайного распределения, число случайных перестановок 1000. в — Распределение пересечения подавленных генов, q -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,98. г — Распределение пересечения активированных генов, q -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,17

периментальных данных статистический уровень значимости ($p < 0,05$) был пройден для 1600 генов, из которых 402 были активированы и 1198 подавлены в группе ответчиков на терапию. Для литературных данных было выявлено 2235 дифференциальных генов ($p < 0,05$), где 1049 были активированы и 1186 – подавлены у ответчиков (табл. S4 в Приложении). В свою очередь, пересечение экспериментальных и литературных данных дало 15 активированных и 27 подавленных генов в группе ответчиков (рис. 2, а и б).

Статистическая значимость этого пересечения была исследована путем пересечения случайных групп генов того же размера со случайной перестановкой названий генов. Как для активированных, так и для подавленных генов мы обнаружили, что число пересекшихся генов соответствовало модели случайного распределения и не показало статистически значимого обогащения (рис. 2, в и г). Мы также сравнили экспрессию гена *ERBB2*, кодирующего молекулярную мишень трастузумаба, между ответчиками и неответчиками, но не обнаружили существенных различий как для экспериментальных, так и для литературных данных (рис. S1 в Приложении).

Для дифференциально регулируемых генов с помощью ПО OncoBox [29] мы вычислили УАП для 1754 внутриклеточных молекулярных путей, имеющих, по крайней мере, 10 генных продуктов в своем составе. Мы провели поиск статистически значимо дифференциально регулируемых путей ($p < 0,05$) и обнаружили 246 путей для экспериментальных данных (79 активированных и 167 подавленных в группе ответчиков) и 424 – для литературных данных (161 активированных и 263 подавленных в группе ответчиков), (табл. S5 в Приложении). При пересечении дифференциально регулируемых путей для групп ответчиков и неответчиков мы получили случайное значение для подавленных путей, но неслучайное (q -значение = 0,002) для 15 активированных путей (рис. 3).

Среди этих 15 активированных путей (табл. 3) наиболее статистически значимыми по критерию Уилкоксона–Манна–Уитни были следующие два: «PPAR Pathway» и «сAMP Protein Retention Pathway». Профиль активации пути для «сAMP Protein Retention Pathway», который также был связан со временем до прогрессирования в последующем анализе, представлен для ответчиков и неответчиков на рис. 4.

Кроме того, среди пересечения молекулярных путей, подавленных в группе ответчиков, присутствовал путь «ErbB Family Pathway», включающий продукт гена *ERBB2* (рис. 5). Од-

нако как было указано ранее, пересечение подавленных путей между экспериментальной и литературной выборками имеет признаки случайного совпадения (рис. 3, в).

Затем для каждого из 15 общих путей, активированных у ответчиков, мы исследовали способность дискриминировать ответчиков от неответчиков на терапию трастузумабом. Для этого вычисляли отношения рисков (от англ. Hazard Ratio) и p -значения теста Log-rank. Для этого анализа мы объединили пациентов из обеих выборок, для которых была доступна информация о времени до прогрессии заболевания. Затем пациенты были разделены на две группы с уровнями активации пути выше и ниже, чем медианное значение. Мы обнаружили, что 12 исследованных дифференциально активированных путей могут служить маркерами выживаемости без прогрессирования заболевания. Для путей «PPAR», «noradrenaline and adrenaline degradation» и «Drug metabolism cytochrome P450 pathway» p -значение Log-rank теста превышало 0,05 (табл. 3). При этом путь «сAMP Protein Retention pathway» показал лучшую эффективность как для предсказания ответа на терапию, так и для прогнозирования времени до прогрессии (рис. 6). Дополнительно мы рассчитали площадь под ROC-кривой (AUC), которая является универсальной характеристикой качества биомаркеров, основанной на значениях чувствительности и специфичности [38]. Этот статистический подход широко применим к различным типам биомаркеров в онкологии [14, 16, 17, 39–41]. AUC положительно коррелирует с качеством биомаркера и изменяется в интервале 0,5–1. Стандартный порог дискриминации составляет 0,7, и биомаркеры с большим значением AUC считаются высококачественными, и наоборот [42]. Путь «сAMP Pathway Protein Retention» показал самое высокое значение AUC и самое низкое наблюдаемое отношение рисков [AUC равно 1 для экспериментального и 0,867 – для литературного набора данных; отношение рисков 0,34 (95% доверительный интервал: 0,11–1, p -значение = 0,05)] (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой статье мы получили экспрессионные профили для 23 образцов фиксированной в формалине парафинизированной ткани РМЖ, полученных от HER2-положительных пациентов-ответчиков или неответчиков на лечение трастузумабом. Для групп, отвечающих и не отвечающих на лечение, мы определили дифференциально регулируемые гены и молекулярные

пути. Затем мы сравнили полученные результаты с 42 опубликованными профилями РНК-секвенирования тканей РМЖ пациентов с известным статусом ответа на терапию трастузума-

бом, которые ранее участвовали в клинических исследованиях NCT00513292 и NCT00353483 [4]. Интересно, что мы не обнаружили корреляции между статусом ответа и уровнем экспрес-

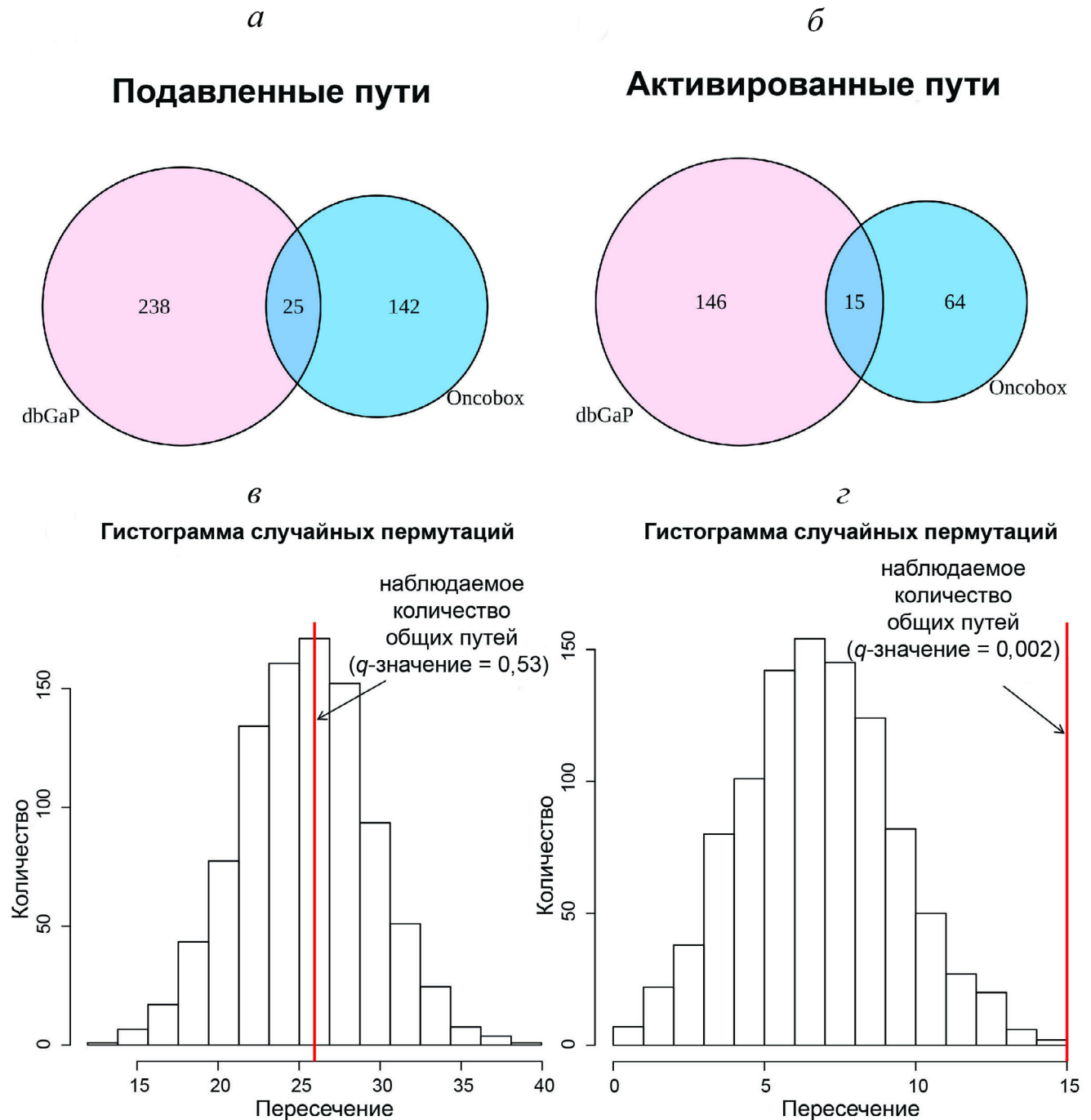


Рис. 3. Пересечение дифференциально регулируемых молекулярных путей между экспериментальными и литературными наборами данных. Диаграммы Венна показывают пересечение групп подавленных (*а*) и активированных (*б*) путей между экспериментальным (NCT03521245) и литературным (dbGaP: phs001291.v1.p1) наборами данных. Гистограммы (*в* и *г*) показывают фактически наблюдаемое, а также теоретически ожидаемое количество дифференциально регулируемых путей исходя из модели случайного распределения, число случайных перестановок 1000. *в* – Распределение пересечения подавленных путей, q -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,53. *г* – Распределение пересечения активированных путей, q -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,002

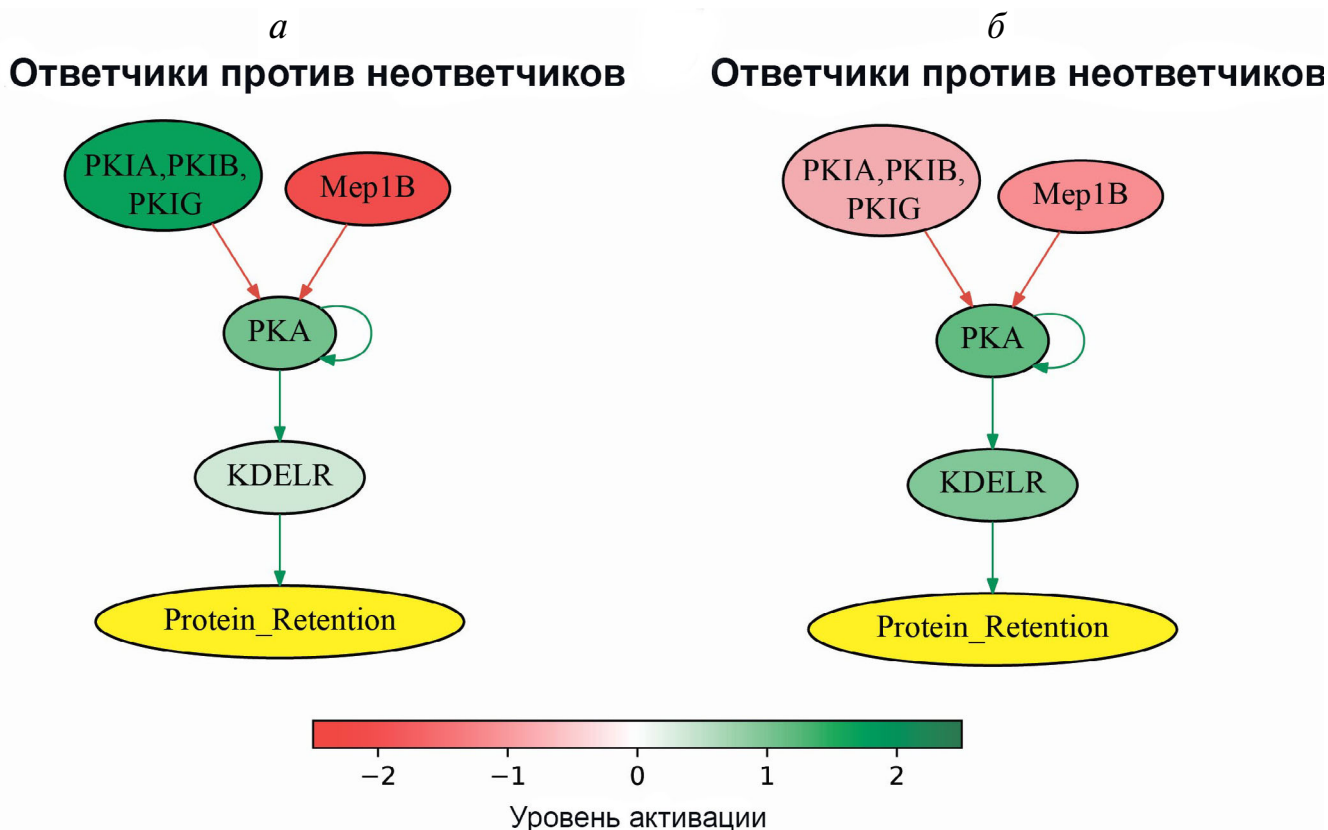


Рис. 4. Профиль дифференциальной активации молекулярного пути «cAMP Protein Retention Pathway» у ответчиков на терапию трастузумабом против неотвеччиков в экспериментальном (а) и литературном (б) наборах данных

сии гена *ERBB2*. При пересечении наборов выявленных дифференциально регулируемых генов и молекулярных путей в обеих выборках, мы обнаружили 15 активированных и 27 подавленных генов и 15/25 путей соответственно. Тем не менее статистически значимым по сравнению с моделью случайного распределения оказалось только пересечение молекулярных путей, активированных у ответчиков по сравнению с неотвечниками. При использовании классификатора, построенного на основе наиболее активированного молекулярного пути «cAMP Pathway Protein Retention», мы получили AUC равное 1 и 0,87 для прогнозирования ответа HER2-положительного метастатического РМЖ на трастузумаб в экспериментальной и литературной выборках соответственно. При объединении выборок этот путь также являлся прогностическим маркером времени до рецидивирования ($p = 0,041$).

Опубликовано множество исследований, где профилировали экспрессию генов для образцов пациентов с РМЖ, получавших трастузумаб [40, 43, 44]. Но лишь малая их часть содержит статус ответа на терапию, связанный с профилем экспрессии, а также данные о выживаемости для зарегистрированных клинических случаев.

Кроме того, в большинстве таких исследований для молекулярного профилирования использовали технологию микрочипирования [45–47]. В нашем исследовании для этого применяли РНК-секвенирование, которое в настоящее время считается золотым стандартом профилирования генной экспрессии [48, 49]. Кроме того, мы использовали секвенирование тотальной РНК без поли(А) обогащения, и в будущих исследованиях наш набор данных может быть использован также для изучения связи некодирующих РНК с устойчивостью к трастузумабу. Наконец, это единственный набор данных по образцам РМЖ, связанным с ответом на трастузумаб, который полностью совместим с базой данных здоровых нормальных тканей ANTE в силу использования того же экспериментального протокола [50].

Мы сравнили гены и пути, которые разделяли ответчиков и неотвеччиков на терапию трастузумабом, как по нашим экспериментальным, так и по литературным данным [4]. Предыдущее исследование было направлено на выявление биомаркеров ответа на трастузумаб на геномном и транскриптомном уровне. Авторы не нашли гены или их сигнатуры, связанные с ответом на

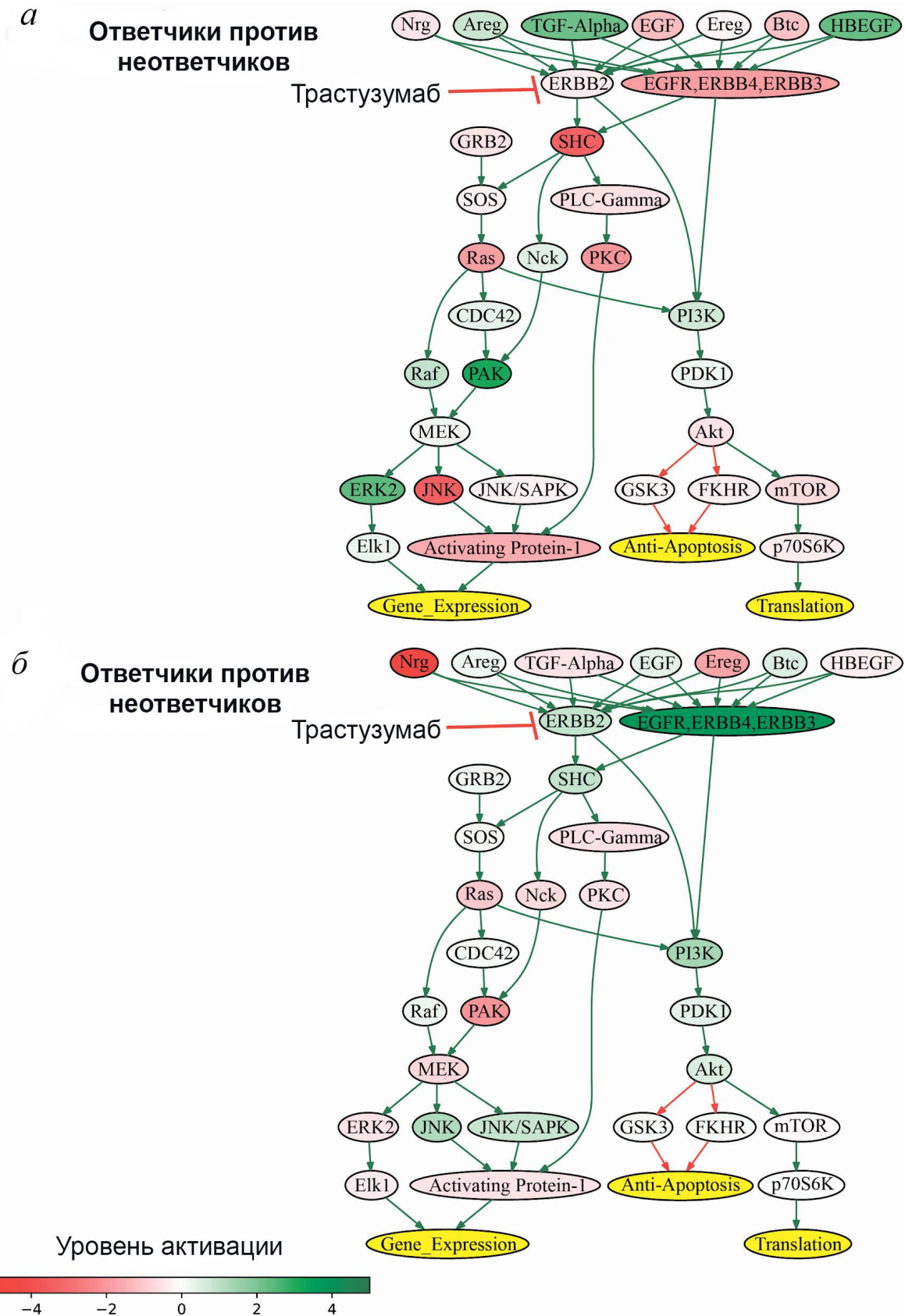


Рис. 5. Профиль дифференциальной активации молекулярного пути «ErbB Family Pathway» у ответчиков на терапию трастузумабом против неотвеччиков в экспериментальном (а) и литературном (б) наборах данных

трастузумаб по данным секвенирования РНК [4]. Вероятно, это связано с тем, что авторы не стратифицировали пациентов по статусу рецепторов гормонов ER и PR, как было сделано в настоящем исследовании. Тогда как общие для обеих групп данных дифференциальные гены с высокой вероятностью представляют результат случайного совпадения, фактическое число активированных у ответчиков молекулярных путей оказалось существенно выше, чем можно было бы ожидать исходя из модели случайного пересечения. В частности, лучшая связь с чувствительностью к трастузумабу наблюдалась для одной из ветвей сигнального пути цАМФ (табл. 3).

цАМФ является первым описанным вторичным мессенджером, который играет фундаментальную роль в клеточном ответе на самые разные внешние стимулы [51]. Одной из функций молекулярного пути цАМФ является активация рецептора KDE1 (Lys-Asp-Glu-Leu), отвечающего за ретроградный транспорт белков из комплекса Гольджи в эндоплазматический ретикулум, что необходимо для поддержания устойчивого гомеостаза клетки [52]. Ранее было показано, что изменения в этом комплексе процессов могут приводить к метастазированию РМЖ посредством измененной локализации рецепторов [53]. Кроме того, внутренние дефекты механизма эндоцитоза, ответственного за деградацию HER2, коррелируют с невосприимчивостью к терапии трастузумабом [54]. Однако, насколько нам известно, настоящее исследование впервые указывает на возможную связь между ретроградным транспортом и устойчивостью к трастузумабу.

Предыдущие исследования показали несколько других возможных механизмов устойчивости к трастузумабу при раке молочной железы [55]. Во-первых, с такой резистентностью могут быть связаны другие рецепторы семейства HER, например HER2-позитивные, но негативные по HER3 пациенты в основном выживают без метастазирования [56]. Рецепторы семейств, отличных от HER, такие как FGFR и IGF-1R, также могут играть важную роль в устойчивости к трастузумабу [57, 58]. Существует также возможная роль андрогенного рецептора (AR), поскольку экспрессия AR отрицательно коррелирует с инфильтрацией иммунными клетками, что, в свою очередь, связано с устойчивостью к трастузумабу [59, 60].

В нашем исследовании уровень активации пути «сAMP Pathway Protein Retention» оказался надежным биомаркером, разделяющим ответчиков и неответчиков на терапию трастузумабом. Более того, активация этого пути оказалась

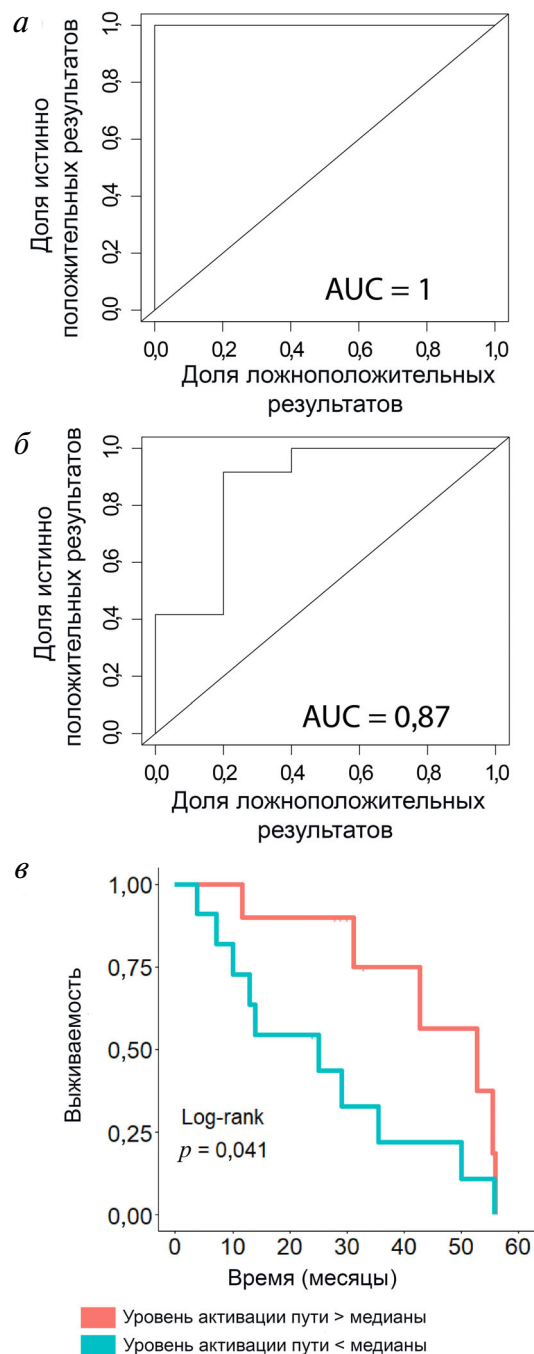


Рис. 6. Прогностическая значимость УАП молекулярного пути «сAMP Pathway Protein Retention» для ответа РМЖ на терапию трастузумабом и предсказания времени до прогрессии. Площадь под ROC-кривой (AUC) для разделения ответчиков и неответчиков для экспериментальной (а) и литературной (б) выборки пациентов. в – Прогностическая значимость уровня активации пути «сAMP Pathway Protein Retention» для предсказания времени до прогрессии пациентов с РМЖ для объединенной экспериментальной и литературной выборки. Отдельно показаны группы пациентов с УАП ниже или выше медианы. Отношение рисков (Hazard ratio) = 0,34 (95% доверительный интервал: 0,11–1; *p*-значение = 0,05). Общее количество генов в путях, а также количество дифференциальных генов в обоих наборах приведены в табл. S6 в Приложении

Таблица 3. Характеристика качества биомаркеров для 15 пересекшихся молекулярных путей, дифференциально активированных в группе ответчиков на терапию трастузумабом

Название молекулярного пути	AUC, экспериментальная выборка	AUC, литературная выборка	Соотношение рисков (95% CI)	p-значение соотношения рисков	p-значение теста Log-rank
cAMP Pathway Protein Retention	1	0,867	0,34 (0,11–1)	0,05	0,041
PPAR Pathway	1	0,867	0,46 (0,16–1,4)	0,16	0,155
cAMP Pathway Cell Proliferation	1	0,85	0,34 (0,11–1)	0,05	0,041
cAMP Pathway eNOS Signaling Cardiovascular Homeostasis	1	0,85	0,34 (0,11–1)	0,05	0,041
cAMP Pathway Glycogen Synthesis	1	0,85	0,17 (0,043–0,64)	0,0094	0,004
cAMP Pathway Lipolysis	1	0,85	0,34 (0,11–1)	0,05	0,041
cAMP Pathway Oncogenesis	1	0,85	0,34 (0,11–1)	0,05	0,041
Noradrenaline and adrenaline degradation	0,95	0,9	0,59 (0,21–1,7)	0,32	0,316
Reactome PRC2 methylates histones and DNA Main Pathway	1	0,85	0,17 (0,045–0,66)	0,01	0,004
cAMP Pathway Degradation of Cell Cycle Regulators	1	0,817	0,34 (0,11–1)	0,05	0,041
Reactome Amyloids Main Pathway	0,95	0,85	0,17 (0,045–0,66)	0,01	0,004
Reactome Condensation of Prophase Chromosomes Main Pathway	0,95	0,85	0,17 (0,045–0,66)	0,01	0,004
Reactome DNA Damage Telomere Stress Induced Senescence Main Pathway	0,95	0,85	0,17 (0,045–0,66)	0,01	0,004
Reactome Packaging of Telomere Ends Main Pathway	0,95	0,85	0,17 (0,045–0,66)	0,01	0,004
KEGG Drug metabolism cytochrome P450 Main Pathway	0,95	0,817	0,47 (0,16–1,4)	0,17	0,158

связана с благоприятным прогнозом в плане предсказания времени до рецидива опухоли. Мы предполагаем, что уровень активации этого пути может служить для дальнейшей разработки молекулярно-диагностических инструментов для раннего выявления пациентов, не отвечающих на HER2-таргетную терапию. Этот путь содержит 14 генов; таким образом, такой диагностический инструмент может основываться на RT-PCR, таргетном РНК-секвенировании, подходе NanoString или любой другой платформе для профилирования экспрессии генов. Тем не менее для продвижения по этому пути потребуются дальнейшая клиническая валидация этого подхода.

Финансирование. Это исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 18-15-00061) (Антон Буздин, Дмитрий Камашев, Ульяна Владимирова, Максим Сорокин, Мария Сунцова) и исследовательской программой OmicsWay в области онкологии.

Конфликт интересов. Авторы М. Сорокин и А. Буздин работают в компании OmicsWay Corp., США. Это исследование получило финансирование от компании Omicsway Corp., США. Компания принимала участие в анализе данных, их интерпретации и написании текста. Компания не принимала участия в разработке дизайна исследования, сборе данных и решении опубликовать данную статью. Остальные авто-

ры заявляют, что исследование проводилось в отсутствие каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могут быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Соблюдение этических норм. От всех пациентов, биоматериал которых был включен в клиническое исследование NCT03521245, озаглавленное «Маркеры активации молекулярных путей, прогнозирующие эффективность терапии трастузумабом HER2-позитивного рака молочной железы», было получено информированное добровольное согласие на участие в исследова-

нии и публикацию его результатов в обезличенной форме. Форма информированного согласия и дизайн исследования были одобрены этическими комитетами ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (г. Петрозаводск) и Многопрофильного медицинского центра «ВитаМед» (г. Москва).

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 7, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Press, M. F., Bernstein, L., Thomas, P. A., Meisner, L. F., Zhou, J. Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R. A., Harris, C., El-Naggar, A., Slamon, D. J., Phillips, R. N., Ross, J. S., Wolman, S. R., and Flom, K. J. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas, *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2894-2904, doi: 10.1200/JCO.1997.15.8.2894.
2. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*, **235**, 177-182, doi: 10.1126/science.3798106.
3. Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., et al. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **134**, 907-922, doi: 10.1043/1543-2165-134.6.907.
4. Lesurf, R., Griffith, O. L., Griffith, M., Hundal, J., Trani, L., Watson, M. A., Aft, R., Ellis, M. J., Ota, D., Suman, V. J., Meric-Bernstam, F., Leitch, A. M., Boughey, J. C., Unzeitig, G., Buzdar, A. U., Hunt, K. K., and Mardis, E. R. (2017) Genomic characterization of HER2-positive breast cancer and response to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy—results from the ACOSOG Z1041 (Alliance) trial, *Ann. Oncol.*, **28**, 1070-1077, doi: 10.1093/annonc/mdx048.
5. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Sekacheva, M., Kim, E., Zhukov, N., Wang, Y., Li, X., Kar, S., Hartmann, C., Samii, A., Giese, A., and Borisov, N. (2018) Molecular pathway activation – New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs, *Semin. Cancer Biol.*, **53**, 110-124, doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.003.
6. Artemov, A., Aliper, A., Korzinkin, M., Lezhnina, K., Jellen, L., Zhukov, N., Roumiantsev, S., Gaifullin, N., Zhavoronkov, A., Borisov, N., and Buzdin, A. (2015) A method for predicting target drug efficiency in cancer based on the analysis of signaling pathway activation, *Oncotarget*, **6**, 29347-29356, doi: 10.18632/oncotarget.5119.
7. Pagani, O., Klingbiel, D., Ruhstaller, T., Nolè, F., Eppenberger, S., Oehlschlegel, C., Bernhard, J., Brauchli, P., Hess, D., Mamot, C., Munzone, E., Pestalozzi, B., Rabaglio, M., Aebi, S., Ribi, K., Rochlitz, C., Rothgiesser, K., Thürlimann, B., von Moos, R., Zaman, K., Goldhirsch, A., and Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) (2017) Do all patients with advanced HER2 positive breast cancer need upfront-chemo when receiving trastuzumab? Randomized phase III trial SAKK 22/99, *Ann. Oncol.*, **28**, 305-312, doi: 10.1093/annonc/mdw622.
8. Schmid, S., Klingbiel, D., Aebi, S., Goldhirsch, A., Mamot, C., Munzone, E., Nolè, F., Oehlschlegel, C., Pagani, O., Pestalozzi, B., Rochlitz, C., Thürlimann, B., von Moos, R., Weder, P., Zaman, K., and Ruhstaller, T. (2019) Long-term responders to trastuzumab monotherapy in first-line HER-2+ advanced breast cancer: characteristics and survival data, *BMC Cancer*, **19**, 902, doi: 10.1186/s12885-019-6105-3.
9. Zhu, X., and Verma, S. (2015) Targeted therapy in her2-positive metastatic breast cancer: a review of the literature, *Curr. Oncol.*, **22**, S19-28, doi: 10.3747/co.22.2363.
10. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 783-792, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
11. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Glusker, A., Aleshin, A., Poddubskaya, E., Sekacheva, M., Kim, E., Gaifullin, N., Giese, A., Seryakov, A., Rumiantsev, P., Moshkovskii, S., and Moiseev, A. (2019) RNA sequencing for research and diagnostics in clinical oncology, *Semin. Cancer Biol.*, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.010.
12. Artibasova, A. V., Korzinkin, M. B., Sorokin, M. I., Shegay, P. V., Zhavoronkov, A. A., Gaifullin, N., Alekseev, B. Y., Vorobyev, N. V., Kuzmin, D. V., Kaprin, A. D., Borisov, N. M., and Buzdin, A. A. (2016) MiRImpact, a new bioinformatic method using complete microRNA expression profiles to assess their overall influence on the activity of intracellular molecular pathways, *Cell Cycle*, **15**, 689-698, doi: 10.1080/15384101.2016.1147633.
13. Buzdin, A. A., Prassolov, V., Zhavoronkov, A. A., and Borisov, N. M. (2017) Bioinformatics meets biomedicine: OncoFinder, a quantitative approach for interrogating molecular pathways using gene expression data, *Methods Mol. Biol.*, **1613**, 53-83, doi: 10.1007/978-1-4939-7027-8_4.
14. Borisov, N. M., Terekhanova, N. V., Aliper, A. M., Venkova, L. S., Smirnov, P. Y., Roumiantsev, S., Korzinkin, M. B., Zhavoronkov, A. A., and Buzdin, A. A. (2014) Signaling pathways activation profiles make better markers of cancer than expression of individual genes, *Oncotarget*, **5**, 10198-10205, doi: 10.18632/oncotarget.2548.

15. Buzdin, A., Sorokin, M., Poddubskaya, E., and Borisov, N. (2019) High-throughput data now complement transcriptomic profiling: advances in molecular pathway activation analysis approach in cancer biology, *Cancer Inform.*, **18**, 1176935119838844, doi: 10.1177/1176935119838844.
16. Zolotovskaia, M. A., Sorokin, M. I., Roumiantsev, S. A., Borisov, N. M., and Buzdin, A. A. (2018) Pathway instability is an effective new mutation-based type of cancer biomarkers, *Front. Oncol.*, **8**, 658, doi: 10.3389/fonc.2018.00658.
17. Lezhnina, K., Kovalchuk, O., Zhavoronkov, A. A., Korzinkin, M. B., Zabolotneva, A. A., Shegay, P. V., Sokov, D. G., Gaifullin, N. M., Rusakov, I. G., Aliper, A. M., Roumiantsev, S. A., Alekseev, B. Y., Borisov, N. M., and Buzdin, A. A. (2014) Novel robust biomarkers for human bladder cancer based on activation of intracellular signaling pathways, *Oncotarget*, **5**, 9022-9032, doi: 10.18632/oncotarget.2493.
18. Ozerov, I. V., Lezhnina, K. V., Izumchenko, E., Artemov, A. V., Medintsev, S., Vanhaelen, Q., Aliper, A., Vijg, J., Osipov, A. N., Labat, I., West, M. D., Buzdin, A., Cantor, C. R., Nikolsky, Y., Borisov, N., Irincheeva, I., Khokhlovich, E., Sidransky, D., Camargo, M. L., and Zhavoronkov, A. (2016) *In silico* Pathway Activation Network Decomposition Analysis (iPANDA) as a method for biomarker development, *Nat. Commun.*, **7**, 13427, doi: 10.1038/ncomms13427.
19. Buzdin, A. A., Zhavoronkov, A. A., Korzinkin, M. B., Roumiantsev, S. A., Aliper, A. M., Venkova, L. S., Smirnov, P. Y., and Borisov, N. M. (2014) The OncoFinder algorithm for minimizing the errors introduced by the high-throughput methods of transcriptome analysis, *Front. Mol. Biosci.*, **1**, 8, doi: 10.3389/fmolb.2014.00008.
20. Borisov, N., Suntsova, M., Sorokin, M., Garazha, A., Kovalchuk, O., Aliper, A., Il'nitskaya, E., Lezhnina, K., Korzinkin, M., Tkachev, V., Saenko, V., Saenko, Y., Sokov, D. G., Gaifullin, N. M., Kashintsev, K., Shirokorad, V., Shabalina, I., Zhavoronkov, A., Mishra, B., Cantor, C. R., and Buzdin, A. (2017) Data aggregation at the level of molecular pathways improves stability of experimental transcriptomic and proteomic data, *Cell Cycle*, **16**, 1810-1823, doi: 10.1080/15384101.2017.1361068.
21. Zhu, Q., Izumchenko, E., Aliper, A. M., Makarev, E., Paz, K., Buzdin, A. A., Zhavoronkov, A. A., and Sidransky, D. (2015) Pathway activation strength is a novel independent prognostic biomarker for cetuximab sensitivity in colorectal cancer patients, *Hum. Genome Var.*, **2**, 15009, doi: 10.1038/hgv.2015.9.
22. Poddubskaya, E. V., Baranova, M. P., Allina, D. O., Sekacheva, M. I., Makovskaia, L. A., Kamashev, D. E., Suntsova, M. V., Barbara, V. S., Kochergina-Nikitskaya, I. N., and Aleshin, A. A. (2019) Personalized prescription of imatinib in recurrent granulosa cell tumor of the ovary: case report, *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.*, **5**, doi: 10.1101/mcs.a003434.
23. Poddubskaya, E. V., Baranova, M. P., Allina, D. O., Smirnov, P. Y., Albert, E. A., Kirilchev, A. P., Aleshin, A. A., Sekacheva, M. I., and Suntsova, M. V. (2018) Personalized prescription of tyrosine kinase inhibitors in unresectable metastatic cholangiocarcinoma, *Exp. Hematol. Oncol.*, **7**, 21, doi: 10.1186/s40164-018-0113-x.
24. Poddubskaya, E., Bondarenko, A., Boroda, A., Zotova, E., Glusker, A., Sletina, S., Makovskaia, L., Kopylov, P., Sekacheva, M., Moisseev, A., and Baranova, M. (2019) Transcriptomics-guided personalized prescription of targeted therapeutics for metastatic ALK-positive lung cancer case following recurrence on ALK inhibitors, *Front. Oncol.*, **9**, 1026, doi: 10.3389/fonc.2019.01026.
25. Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., and Andridge, R. (2018) Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **27**, 619-626, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0627.
26. Prat, A., Carey, L. A., Adamo, B., Vidal, M., Tabernero, J., Cortés, J., Parker, J. S., Perou, C. M., and Baselga, J. (2014) Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **106**, doi: 10.1093/jnci/dju152.
27. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
28. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
29. Sorokin, M., Kholodenko, R., Suntsova, M., Malakhova, G., Garazha, A., Kholodenko, I., Poddubskaya, E., Lantsov, D., Stilidi, I., Arhiri, P., Osipov, A., and Buzdin, A. (2018) Oncobox bioinformatical platform for selecting potentially effective combinations of target cancer drugs using high-throughput gene expression data, *Cancers*, **10**, doi: 10.3390/cancers10100365.
30. Croft, D., Mundo, A. F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M. R., Jassal, B., Jupe, S., Matthews, L., May, B., Palatnik, S., Rothfels, K., Shamovsky, V., Song, H., Williams, M., Birney, E., Hermjakob, H., Stein, L., and D'Eustachio, P. (2014) The Reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D472-477, doi: 10.1093/nar/gkt1102.
31. Schaefer, C. F., Anthony, K., Krupa, S., Buchoff, J., Day, M., Hannay, T., and Buetow, K. H. (2009) PID: the Pathway Interaction Database, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D674-D679, doi: 10.1093/nar/gkn653.
32. Kanehisa, M. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 27-30, doi: 10.1093/nar/28.1.27.
33. Romero, P., Wagg, J., Green, M. L., Kaiser, D., Krummenacker, M., and Karp, P. D. (2005) Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome, *Genome Biol.*, **6**, R2, doi: 10.1186/gb-2004-6-1-r2.
34. Nishimura, D. (2001) BioCarta, *Biotech Software and Internet Report*, **2**, 117-120, doi: 10.1089/152791601750294344.
35. Igol'kina, A. A., Zinkevich, A., Karandasheva, K. O., Popov, A. A., Selifanova, M. V., Nikolaeva, D., Tkachev, V., Penzar, D., Nikitin, D. M., and Buzdin, A. (2019) H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3 and H3K9me3 histone tags suggest distinct regulatory evolution of open and condensed chromatin landmarks, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/cells8091034.
36. Marggraf, M. B., Panteleev, P. V., Emelianova, A. A., Sorokin, M. I., Bolosov, I. A., Buzdin, A. A., Kuzmin, D. V., and Ovchinnikova, T. V. (2018) Cytotoxic potential of the novel horseshoe crab peptide polyphemusin III, *Mar. Drugs*, **16**, doi: 10.3390/md16120466.
37. Buzdin, A., Garazha, A., Sorokin, M., Glusker, A., Aleshin, A., Allina, D., Suntsova, M., Tkachev, V., Borger, P., Borisov, N., and Gaifullin, N. (2019) RNA sequencing analysis for profiling activation of cancer-associated molecular pathways, *J. Clin. Oncol.*, **37**, e13032-e13032, doi: 10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e13032.
38. Green, D. M., Swets, J. A. (1966) *Signal Detection Theory and Psychophysics*, New York.

39. Chen, L., Zhou, Y., Tang, X., Yang, C., Tian, Y., Xie, R., Chen, T., Yang, J., Jing, M., Chen, F., Wang, C., Sun, H., and Huang, Y. (2019) EGFR mutation decreases FDG uptake in non-small cell lung cancer via the NOX4/ROS/GLUT1 axis, *Int. J. Oncol.*, **54**, 370-380, doi: 10.3892/ijo.2018.4626.
40. Tanioka, M., Fan, C., Parker, J. S., Hoadley, K. A., Hu, Z., Li, Y., Hyslop, T. M., Pitcher, B. N., Soloway, M. G., Spears, P. A., Henry, L. N., Tolaney, S., Dang, C. T., Krop, I. E., Harris, L. N., Berry, D. A., Mardis, E. R., Winer, E. P., Hudis, C. A., Carey, L. A., and Perou, M. (2018) Integrated analysis of RNA and DNA from the phase III trial CALGB 40601 identifies predictors of response to trastuzumab-based neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 5292-5304, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3431.
41. Liu, T., Cheng, G., Kang, X., Xi, Y., Zhu, Y., Wang, K., Sun, C., Ye, J., Li, P., and Yin, H. (2018) Noninvasively evaluating the grading and IDH1 mutation status of diffuse gliomas by three-dimensional pseudo-continuous arterial spin labeling and diffusion-weighted imaging, *Neuroradiology*, **60**, 693-702, doi: 10.1007/s00234-018-2021-5.
42. Boyd, J. C. (1997) Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **227**, 46-63.
43. Hendricks, W. P. D., Briones, N., Halperin, R. F., Facista, S., Heaton, P. R., Mahadevan, D., and Kim, S. (2019) PD-1-associated gene expression signature of neoadjuvant trastuzumab-treated tumors correlates with patient survival in HER2-positive breast cancer, *Cancers*, **11**, doi: 10.3390/cancers11101566.
44. Okuma, H. S., Koizumi, F., Hirakawa, A., Nakatochi, M., Komori, O., Hashimoto, J., Kodaira, M., Yunokawa, M., Yamamoto, H., Yonemori, K., Shimizu, C., Fujiwara, Y., and Tamura, K. (2016) Clinical and microarray analysis of breast cancers of all subtypes from two prospective preoperative chemotherapy studies, *Br. J. Cancer*, **115**, 411-419, doi: 10.1038/bjc.2016.184.
45. Popovici, V., Chen, W., Gallas, B. G., Hatzis, C., Shi, W., Samuelson, F. W., Nikolsky, Y., Tsyganova, M., Ishkin, A., Nikolskaya, T., Hess, K. R., Valero, V., Booser, D., Delorenzi, M., Hortobagyi, G. N., Shi, L., Symmans, W. F., and Pusztai, L. (2010) Effect of training-sample size and classification difficulty on the accuracy of genomic predictors, *Breast Cancer Res.*, **12**, R5, doi: 10.1186/bcr2468.
46. Shi, L., Campbell, G., Jones, W. D., Campagne, F., Wen, Z., et al. (2010) The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 827-838, doi: 10.1038/nbt.1665.
47. Sonnenblick, A., Brohée, S., Fumagalli, D., Rothé, F., Vincent, D., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Salgado, R., Sirtaine, N., Loi, S., Neven, P., Loibl, S., Denkert, C., Joensuu, H., Piccart, M., and Sotiriou, C. (2015) Integrative proteomic and gene expression analysis identify potential biomarkers for adjuvant trastuzumab resistance: analysis from the Fin-her phase III randomized trial, *Oncotarget*, **6**, 30306-30316, doi: 10.18632/oncotarget.5080.
48. Nault, R., Fader, K. A., and Zacharewski, T. (2015) RNA-Seq versus oligonucleotide array assessment of dose-dependent TCDD-elicited hepatic gene expression in mice, *BMC Genomics*, **16**, 373, doi: 10.1186/s12864-015-1527-z.
49. SEQC/MAQC-III Consortium (2014) A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 903-914, doi: 10.1038/nbt.2957.
50. Suntsova, M., Gaifullin, N., Allina, D., Reshetun, A., Li, X., Mendeleeva, L., Surin, V., Sergeeva, A., Spirin, P., Prassolov, V., Morgan, A., Garazha, A., Sorokin, M., and Buzdin, A. (2019) Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues, *Sci. Data*, **6**, 36, doi: 10.1038/s41597-019-0043-4.
51. Kumar, N., Prasad, P., Jash, E., Saini, M., Husain, A., Goldman, A., and Sehrawat, S. (2018) Insights into exchange factor directly activated by cAMP (EPAC) as potential target for cancer treatment, *Mol. Cell. Biochem.*, **447**, 77-92, doi: 10.1007/s11010-018-3294-z.
52. Capitani, M., and Sallesse, M. (2009) The KDEL receptor: new functions for an old protein, *FEBS Lett.*, **583**, 3863-3871, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.053.
53. Maisel, S. A., and Schroeder, J. (2019) Wrong place at the wrong time: how retrograde trafficking drives cancer metastasis through receptor mislocalization, *J. Cancer Metastasis Treat.*, **2019**, doi: 10.20517/2394-4722.2018.82.
54. Valabrega, G., Montemurro, F., Sarotto, I., Petrelli, A., Rubini, P., Tacchetti, C., Aglietta, M., Comoglio, P. M., and Giordano, S. (2005) TGF α expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation, *Oncogene*, **24**, 3002-3010, doi: 10.1038/sj.onc.1208478.
55. Ahmad, A. (2019) Current updates on trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancers, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1152**, 217-228, doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_10.
56. Adamczyk, A., Kruczak, A., Harazin-Lechowska, A., Ambicka, A., Grela-Wojewoda, A., Domagala-Haduch, M., Janecka-Widla, A., Majchrzyk, K., Cichocka, A., Rys, J., and Niemiec, J. (2018) Relationship between HER2 gene status and selected potential biological features related to trastuzumab resistance and its influence on survival of breast cancer patients undergoing trastuzumab adjuvant treatment, *Onco Targets Ther.*, **11**, 4525-4535, doi: 10.2147/OTT.S166983.
57. Hanker, A. B., Garrett, J. T., Estrada, M. V., Moore, P. D., Ericsson, P. G., et al. (2017) HER2-overexpressing breast cancers amplify FGFR signaling upon acquisition of resistance to dual therapeutic blockade of HER2, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 4323-4334, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2287.
58. Lenz, G., Hamilton, A., Geng, S., Hong, T., Kalkum, M., Momand, J., Kane, S. E., and Huss, J. M. (2018) t-Darpp activates IGF-1R signaling to regulate glucose metabolism in trastuzumab-resistant breast cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 1216-1226, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0824.
59. Martinez, V. G., O'Neill, S., Salimu, J., Breslin, S., Clayton, A., Crown, J., and O'Driscoll, L. (2017) Resistance to HER2-targeted anti-cancer drugs is associated with immune evasion in cancer cells and their derived extracellular vesicles, *Oncoimmunology*, **6**, e1362530, doi: 10.1080/2162402X.2017.1362530.
60. Van Rooijen, J. M., Qiu, S. Q., Timmer-Bosscha, H., van der Vegt, B., Boers, J. E., Schroder, C. P., and de Vries, E. G. E. (2018) Androgen receptor expression inversely correlates with immune cell infiltration in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer, *Eur. J. Cancer*, **103**, 52-60, doi: 10.1016/j.ejca.2018.08.001.

MOLECULAR PATHWAY ACTIVATION MARKERS ARE LINKED WITH EFFICACY OF TRASTUZUMAB THERAPY IN METASTATIC HER2-POSITIVE BREAST CANCER BETTER THAN INDIVIDUAL GENE EXPRESSION LEVELS*

M. Sorokin^{1,2,3}, K. Ignatev⁴, V. Barbara⁴, U. Vladimirova^{1,3}, A. Muraveva³, M. Suntsova¹,
N. Gaifullin⁵, I. Vorotnikov⁶, D. Kamashev^{1,3}, A. Bondarenko⁷, M. Baranova^{7,8},
E. Poddubskaya^{3,7}, and A. Buzdin^{1,2,3,9**}

¹ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia; E-mail: buzdin@oncobox.com

² OmicsWay Corp., 91789 Walnut, CA, USA

³ Institute of Molecular Medicine of the Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia

⁴ Republican Oncological Dispensary of Karelia Republic, 185016 Petrozavodsk, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia

⁶ Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia

⁷ VitaMed Medical Center, 121309 Moscow, Russia

⁸ Russian Scientific Center of Surgery named after B. V. Petrovsky, 119991 Moscow, Russia

⁹ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Received March 31, 2020

Received May 29, 2020

Accepted May 31, 2020

Increased expression or amplification of HER2 receptor tyrosine kinase gene *ERBB2* is well-known and widely used as a prognostic biomarker of breast cancer (BC) response to the targeted treatment with trastuzumab and its analogs. Considering that part of the BC patients overexpressing HER2 does not respond to trastuzumab, clinical trial NCT03521245 was initiated to identify additional gene expression and molecular pathway activation response biomarkers to trastuzumab treatment in HER2-positive BC. Using RNA sequencing gene expression in 23 formalin-fixed, paraffin embedded HER2 positive BC tissue blocks from patients who either responded or not responded to trastuzumab treatment was profiled. Differentially regulated genes and molecular pathways were identified in the groups of trastuzumab responders and non-responders. These results were next compared with the 42 previously published BC trastuzumab responder and non-responder RNA sequencing profiles from the clinical trials NCT00513292 and NCT00353483. No correlation was observed between the response status and the expression levels of *ERBB2* gene in the HER2 positive BC samples. Analysis of the differentially expressed genes and molecular pathways in the combined dataset revealed 15/27 commonly up/down regulated genes and 15/25 pathways, respectively. However, only the intersection of molecular pathways upregulated in trastuzumab responders vs non-responders was statistically significantly enriched compared to the random expectation model. A classifier built using the most significantly upregulated molecular pathway—cAMP Pathway Protein Retention—demonstrated the best performance for prediction of the HER2 positive BC response to trastuzumab for both our experimental and previously reported data. This pathway also predicted time to recurrence in the combined dataset with Log-rank p-value 0.041.

Keywords: breast cancer, HER2, *ERBB2*, transcriptomics, RNA sequencing, trastuzumab, targeted therapy, personalized medicine, NCT03521245