

Е.Н. Колесников, А.Ю. Максимов, О.И. Кит, Д.С. Кутилин

Зависимость общей и безрецидивной выживаемости больных от молекулярно-генетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России

Плоскоклеточный рак пищевода (ППР) представляет собой группу гетерогенных опухолей с различным прогнозом. В последние годы были выявлены различные молекулярные сигнатуры ППР, отличные в разных популяциях. Целью исследования стало молекулярное типирование ППР пациентов Юга России и оценка выживаемости больных с учетом выявленного молекулярно-генетического подтипа опухоли. Материалом для исследования послужили срезы FFPE-блоков 124 пациентов с ППР. Выделение опухолевых и нормальных клеток пищевода осуществлялось путем лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом. Из клеток фенол-хлороформным методом была проведена экстракция 248 образцов ДНК. Для молекулярного типирования ППР было проведено определение относительной копииности (CNV) 8 генов (*CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6*, *KDM6A*) методом Real-Time qPCR и определение 7 полиморфизмов (SNP) (*NFE2L2* (с.85G>A), *NOTCH1* (с.1379C>T), *NOTCH1* (с.1451G>T), *ZNF750* (с.414C>A), *ZNF750* (с.1621G>A), *SMARCA4* (р.Q758*, с.2272C>T), *KMT2D* (Q5170* , с.15508C>T)) методом прямого секвенирования по Сэнгеру. В ходе исследования у больных ППР популяции Юга России выявлены SNP в генах *NFE2L2*, *NOTCH1*, *SMARCA4*, *KMT2D* и CNV генов *CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6* и *KDM6A*, описанные ранее для популяций Восточной Европы, Канады и США. На основании дифференциальных отличий по SNP и CNV этих генов было верифицировано 3 молекулярно-генетических подтипа плоскоклеточного рака пищевода: ППР-1 был установлен у 31.5%, ППР-2 у 66.1% и ППР-3 у 2.4% больных. При этом у больных ППР с молекулярно-генетическим подтипом ППР-2 установлены более высокие показатели выживаемости по сравнению с ППР-1 и ППР-3. Различия в выживаемости между тремя группами были статистически значимыми ($p=0,00001$). Таким образом, определение молекулярно-генетического подтипа ППР является важным подходом для улучшения прогнозирования течения данного за-

болевания и возможности корректировки соответствующей терапии.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак пищевода; молекулярно-генетический подтип; копияность генов; однонуклеотидные полиморфизмы; лазерная микродиссекция; выживаемость

Рак пищевода (РП) занимает 6 место в структуре онкологической смертности во всем мире: ежегодно регистрируется более 400 тысяч смертей от этого заболевания [1, 2]. Выделяют два основных гистологических типа РП: плоскоклеточный рак пищевода (ППР) и аденокарциному пищевода, которые существенно отличаются по этиологии, географическому распространению, 5-летней общей выживаемости и молекулярно-генетическому профилю, при этом ППР составляет приблизительно 80 % от всех случаев заболевания [2, 3].

ППР представляет собой группу гетерогенных опухолей с различным прогнозом, однако клинические сигнатуры, такие как TNM и локализация опухоли, не являются значимыми факторами прогноза при лечении данного заболевания. В последние годы были проведены несколько исследований, с применением технологии микрочипов или RNA-seq, для изучения профилей дифференциально экспрессируемых генов, miRNAs и некодирующих РНК при ППР. Были выявлены различные молекулярные сигнатуры ППР, причем отличные в разных популяциях, так у вьетнамцев часто встречались мутации гена *NFE2L2* и увеличение копияности гена *SOX2*, у всех пациентов из США и Канады были мутации в гене *SMARCA4* [1]. В настоящее время создана молекулярная классификация, соответствующая каждой популяции, и на основании молекулярно-генетического анализа идентифицированы три подтипа ППР, отличающиеся наличием полиморфизмов (SNP) и/или уровнем копияности (CNV) генов *NFE2L2*, *CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *ATG7*, *NOTCH1*, *ZNF750*, *KDM6A* и *CDK6* [3]. Однако, подобное исследование не проводилось на популяции Юга России, так же, как и не оценивалась связь каждого подтипа ППР с клиническими данными, например, общей и безрецидивной выживаемостью.

Поэтому целью исследования стало молекулярное типирование ПРП пациентов Юга России, а также оценка общей и безрецидивной выживаемости больных с учетом молекулярно-генетического подтипа опухоли.

Материалы и методы

В ретроспективную группу больных были включены 124 пациента с ПРП. Материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded)-блоков пациентов. Срезы толщиной 3 мкм фиксировались на предметных стеклах, покрытых PEN-мембраной (Polyethylene Naphthalate (PEN)-membrane), подвергались депарафинизации (о-ксилолом) и окрашивались гематоксилином-эозином. Для избирательного получения опухолевых и нормальных клеток пищевода был

выбран подход, основанный на лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия) (рис. 1). Из клеток фенол-хлороформным методом проведена экстракция 248 образцов ДНК (124 образца из опухолевых и 124 образца из нормальных клеток пищевода) [4].

Для молекулярного типирования образцов плоскоклеточного рака пищевода проведено определение относительной копийности 8 генетических локусов (*CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6*, *KDM6A*) методом Real-Time qPCR и определение 7 полиморфизмов (*NFE2L2* (с.85G>A), *NOTCH1* (с.1379C>T), *NOTCH1* (с.1451G>T), *ZNF750* (с.414C>A), *ZNF750* (с.1621G>A), *SMARCA4* (р.Q758*, с.2272C>T), *KMT2D* (Q5170* , с.15508C>T)) методом прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 («Life Technologies», США).

Для определения относительной копийности генов и полиморфизмов, с использованием базы данных NCBI

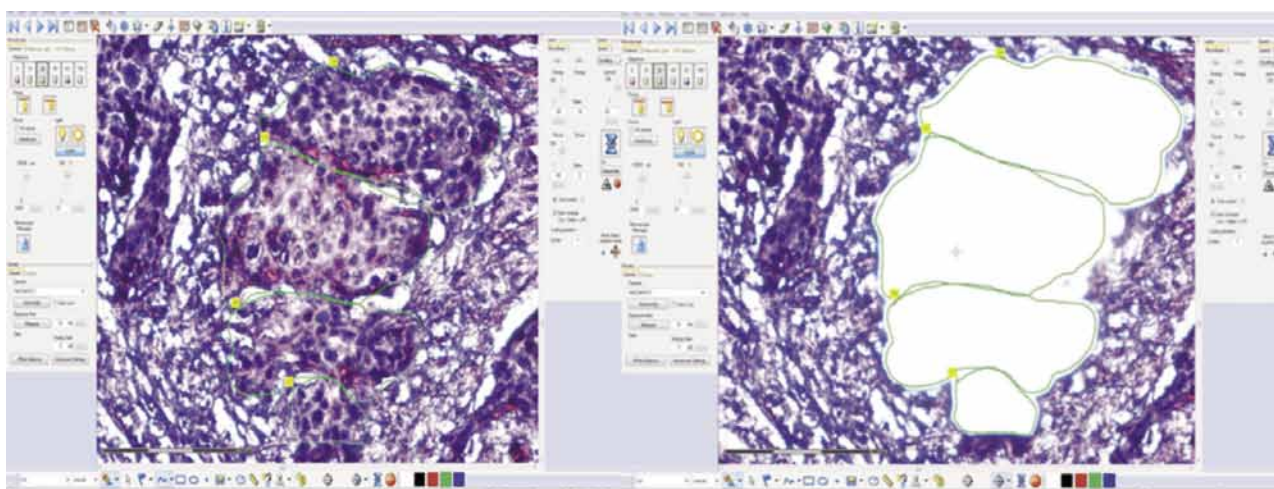


Рис. 1. Выделение клеток плоскоклеточного рака пищевода методом лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (слева до диссекции, справа после)

Таблица 1. Панель праймеров для определения относительной копийности генов и полиморфизмов

№	Наименование гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
	GAPDH	GCTGAACGGGAAGCTCACT	GCAGGTTTTTCTAGACGGCAG
	ACTB	CACCCTGAAGTACCCCATCG	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAG
	B2M	TGAGTGCTGTCTCCATGTTGA	ATTCTCTGCTCCCCACCTCT
	CUL3	ACGAGCACCATGTCTGAATCT	CGAGGAGAGACTCACCGGA
	ATG7	CTCCACCGTTCTCCTAGA	GTAGATAGCCACCCACTGGC
	SOX2	TTT GTC GGA GAC GGA GAA GC	CCG GGC AGC GTG TAC TTA T
	TP63	GGCCTGTCTAGATGTCTGCC	ATCCAGCTAGTCTGTCTCA
	YAP1	GTAACCTGACTTAACAGTGGGA	CACCGTATAGAGACAAAGCAGGAT
	VGLL4	ACATCGCACAAAGTCTCAGT	TCGTGCACGTTTTACTCGGA
	CDK6	TCTCCGAGGTCTGGACTTTCT	GGCCGAAGTCAGCGAGTTT
	KDM6A	TGACACAATTACAACAACCTTTGTGC	GAGCACTGAGGGGATTCGTT
	NFE2L2 (с.85G>A)	CCCACCATCAACAGTGGCATAA	AGCTCATACTCTTTCCGTCGCT
	NOTCH1 (с.1379C>T/ с.1451G>T)	CAGTGTCTGCAGGGCTACA	CTGCTGGCACACTCGTCT
	ZNF750 (с.414C>A)	ATGGACTCTCTGCCTTCGAC	GCCCCTTGAGTCTGTGCT
	ZNF750 (с.1621G>A)	CCCCTCAACCTCTCCAAGAAAT	CTGGGTGTTACAGGGGTCTCT
	SMARCA4 (р.Q758*, с.2272C>T)	TCAGCGCTTATGGTCAATGGT	CAGCTAACCTACCAGACCACAT
	KMT2D (Q5170* , с.15508C>T)	CGATGGCGTGGAAACAAGG	GTGCCAAGTGCATGTTCTTCA

GenBank, были разработаны последовательности 17 пар синтетических олигонуклеотидов (праймеров, прямых и обратных), включая 3 пары для референсных локусов (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*) (табл. 1).

Определение относительной копийности 8 генетических локусов (*CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6*, *KDM6A*) в нормальных и опухолевых клетках пищевода проводили методом Real-Time qPCR. Принцип метода заключается в одновременной амплификации генамишени и референсного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении дозы гена делается на основании анализа соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсной последовательностей [5]. Количественная Real-Time-PCR амплификация проводилась с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве красителя использовали EvaGreen®Dye (Biotium, США). Амплификация каждой из проб осуществлялась в трех повторностях. Усредненные данные по каждому генетическому локусу нормировались по усредненному показателю референсных генов для получения величины ΔCt ($\Delta Ct = Ct(\text{среднее исследуемого гена}) - Ct(\text{среднее референсных генов})$). Относительную копийность генетического локуса (RQ) рассчитывали по формуле $E^{-\Delta Ct}$, где E-эффективность амплификации, рассчитанная по формуле $E = 10^{-1/k}$, где k- коэффициент из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \log P_0 + b$, полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных (E= 1,9343; k= -3,49). Далее вычисляли медиану RQоп опухолевых образцов и медиану RQк контрольных (нормальных) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копийности генов в опухолевых образцах по отношению к нормальным: RQоп/RQк.

Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0. Для проведения кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) и построения тепловых карт использовали приложение Morpheus (Broad Institute, <https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Нормальность распределения показателей оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова (при n>50) и критерия Шапиро-Уилка (при n<50). Оценку различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни для порогового уровня статистической значимости p<0.05 и таблиц сопряженности с применением критерия χ^2 для порогового уровня p<0.05. Общая и безрецидивная выживаемость больных ретроспективной группы была изучена методом Каплана-Мейера, Log-rank тест использовался для оценки различий выживаемости между группами.

Результаты

Верификация молекулярно-генетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода (ППП-1, ППП-2 и ППП-3) осуществлялась в ходе молекулярно-генетического анализа полиморфизмов (SNP) и копийности (CNV) генов *NFE2L2*, *CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *ATG7*, *NOTCH1*, *ZNF750*, *KMT2D*, *SMARCA4*, *KDM6A* и *CDK6*. Перечень SNP и CNV был сформирован на основании анализа литературы [3] и баз данных cBioportal [6] и TCGA [7].

На суммарной выборке, состоящей из 124 пациентов, обнаружено статистически значимое изменение копийности только 1 из 8 генетиче-

ских локусов — *CDK6* (увеличение копийности в 2.9 раза (p<0.05) в опухолевых клетках относительно нормальных (рис. 2.б).

Применение кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) позволило выделить три кластера образцов плоскоклеточного рака пищевода, отличающиеся по копийности генов (рис. 2.а)

Так в первом кластере (39 образцов ППП) статистически значимо (p<0.005) повышена копийность генов *SOX2*, *TP63*, *YAP1* в 5.8, 4.7 и 4.2 раза соответственно, и понижена копийность генов *CUL3*, *ATG7* и *VGLL4* в 1.4, 1.4 и 1.7 раза соответственно в опухолевых клетках относительно нормальных. Во втором кластере (82 образца ППП) в опухолевых клетках относительно нормальных статистически значимо (p<0.05) повышена копийность гена *CDK6* в 3.0 раза и понижена копийность *KDM6A* в 1,2 раза соответственно. В третьем кластере (3 образца ППП) в опухолевых клетках относительно нормальных статистически значимо (p<0.05) понижена копийность гена *ATG7* в 1.3 раза (рис. 2.в). Далее образцы из каждого кластера были проанализированы на наличие/отсутствие следующих полиморфизмов: *NFE2L2* (с.85G>A), *NOTCH1* (с.1379C>T), *NOTCH1* (с.1451G>T), *ZNF750* (с.414C>A), *ZNF750* (с.1621G>A), *SMARCA4* (p.Q758*, с.2272C>T) и *KMT2D* (Q5170*, с.15508C>T).

В 31% образцов из первого кластера был обнаружен SNP с.85G>A в гене *NFE2L2* (у 8% в гомозиготном состоянии, у 92% в гетерозиготном), в 23% образцах из второго кластера был обнаружен SNP с.1379C>T (у 5% в гомозиготном состоянии, у 95% в гетерозиготном) и в 26% образцов SNP с.1451G>T (у 10% в гомозиготном состоянии, у 90% в гетерозиготном) в гене *NOTCH1*, в 18% и 12% образцов из второго кластера были обнаружены SNP с.414C>A (у 6% в гомозиготном состоянии, у 94% в гетерозиготном) и с.1621G>A (у 10% в гомозиготном состоянии, у 90% в гетерозиготном) соответственно в гене *ZNF750*, в 100% и 67% образцов из третьего кластера были обнаружены SNP p.Q758* и Q5170* в генах *SMARCA4* и *KMT2D* соответственно (в гетерозиготном состоянии) (рис. 2.г).

Таким образом, кластеры отличаются друг от друга и по наличию/отсутствию перечисленных выше полиморфизмов. На основании этих данных все исследованные образцы плоскоклеточного рака пищевода можно дифференцировать на 3 молекулярно-генетических подтипа. Перечень SNP и CNV характеризующий определенный подтип (ППП-1, ППП-2 и ППП-3) плоскоклеточного рака пищевода представлен в таблице 2.

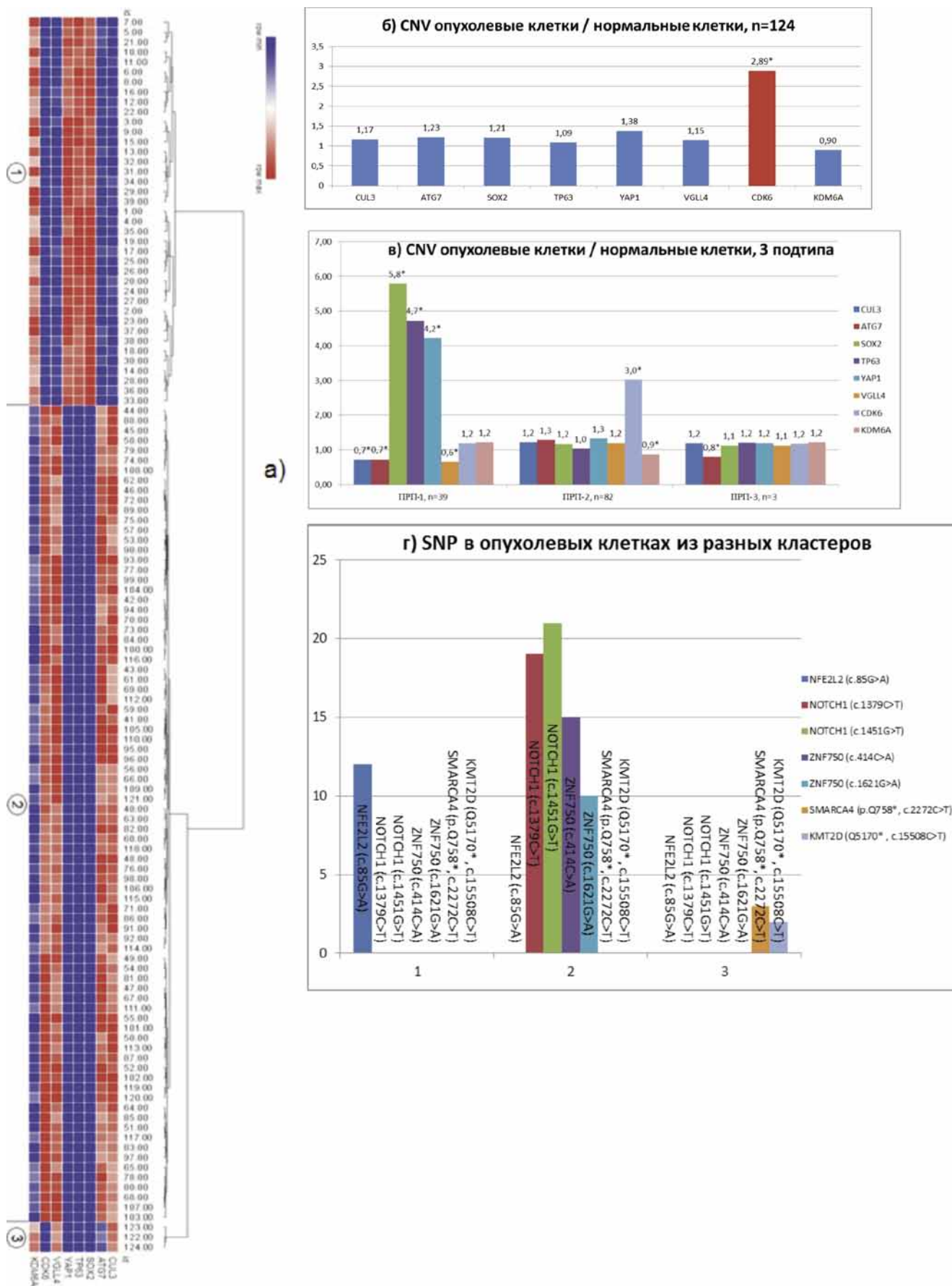


Рис. 2. SNP и CNV (копийность*) генов: а) кластерный анализ копийности генов, б) копийность генов в выборке из 124 пациентов, в) копийность генов в трех выделенных кластерах (ППП1-3), г) мутации в опухолевых клетках из разных кластеров.

* копийность генов в опухолевых клетках относительно нормальных

Таблица 2. Характерные SNP и CNV для подтипов плоскоклеточного рака пищевода

Подтип	CNV								SNP			
	CDK6	CUL3	ATG7	SOX2	TP63	YAP1	VGLL4	KDM6A	NOTCH1 (с.1379C>T или с.1451G>T)	ZNF750 (с.414C>A или с.1621G>A)	NFE2L2 (с.85G>A)	KMT2D/ SMARCA4
ПРП-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
ПРП-2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
ПРП-3		-	+	-	-	-	-		-	-	-	+/+

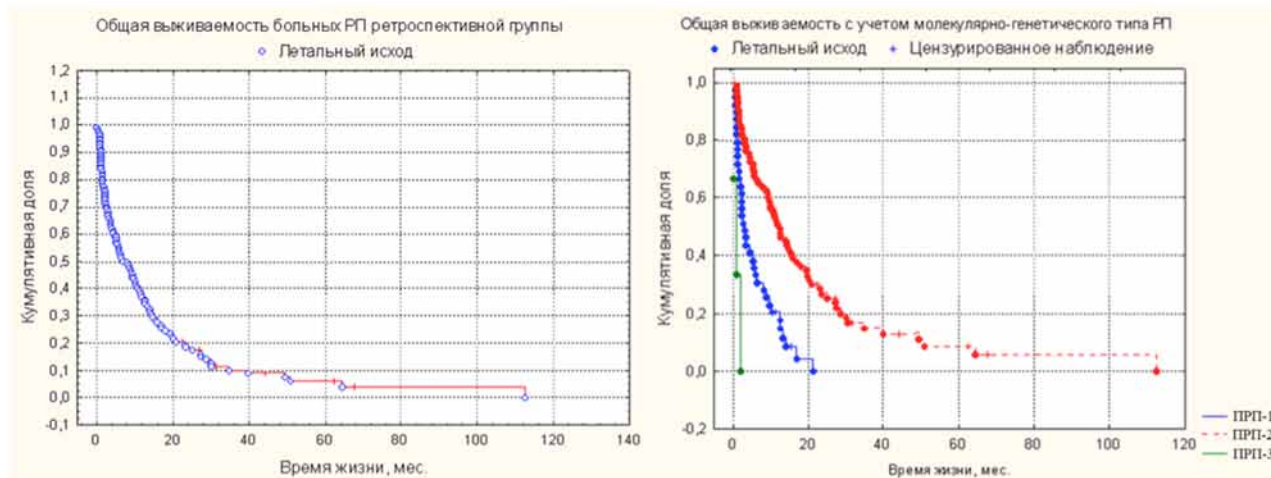


Рис. 3. Общая выживаемость больных ПРП: а) без учета молекулярно-генетического подтипа (слева), б) с учетом молекулярно-генетического подтипа (справа)

Общая и безрецидивная выживаемость больных ПРП была изучена методом Каплана-Мейера (рис. 3.а).

Кумулятивная доля выживания за 20 мес. после операции в общем по группе (124 пациента) прогрессивно снижалась с 1.0 до 0.2. Медиана показателя кумулятивной доли выживания составила 7.2 мес. Нижний квартиль (25%) соответствовал 2.05 мес., а верхний квартиль (75%) — 17.6 мес. Средняя величина выживаемости в общем по группе составила 12.1±1.47 мес.

Кривые Каплана-Мейера по общей выживаемости больных ПРП с учетом молекулярно-генетического подтипа ПРП отражены на рис. 3.б.

Более высокие показатели выживаемости наблюдались у пациентов с молекулярно-генетическим типом ПРП-2, а самые низкие — при типе ПРП-3. Промежуточные значения выживаемости были характерны для пациентов с молекулярно-генетическим типом ПРП-1. Различия выживаемости между тремя группами было статистически значимыми (p=0.00001). Медиана дожития после операции у больных РП с молекулярно-генетическим типом ПРП-1 составила 2.4 мес., типом ПРП-2 — 10.8 мес. и типом ПРП-3 — 0.7 мес. Средняя выживаемость в подгруппе с типом ПРП-1 имела значение 4.6±0.74 мес., типом ПРП-2 — 16.1±2.0 мес. и типом ПРП-3 — 0.88±0.56 мес.

Ввиду малочисленности подгруппы пациентов с молекулярно-генетическим типом ПРП-3 далее оценивали различие общей выживаемости между двумя подгруппами с подтипом ПРП-1 и ПРП-2. Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости больных ПРП с молекулярным подтипом ПРП-1 и ПРП-2 представлены на рис. 4. Log-rank тест показал, что различие выживаемости между двумя подгруппами было статистически значимым (test statistic = 3.96 p = 0.00007).

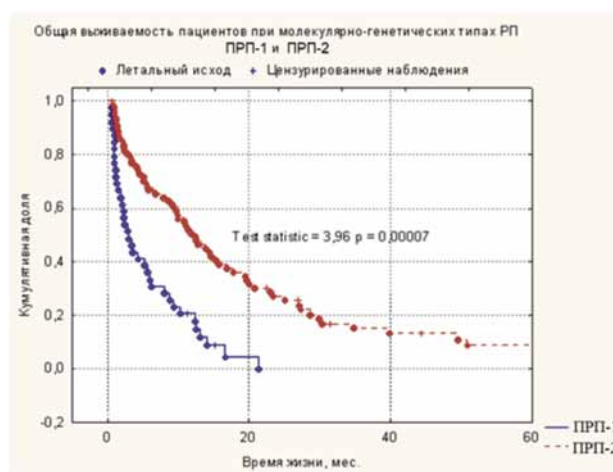


Рис. 4. Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости больных ПРП с молекулярно-генетическим подтипом ПРП-1 и ПРП-2

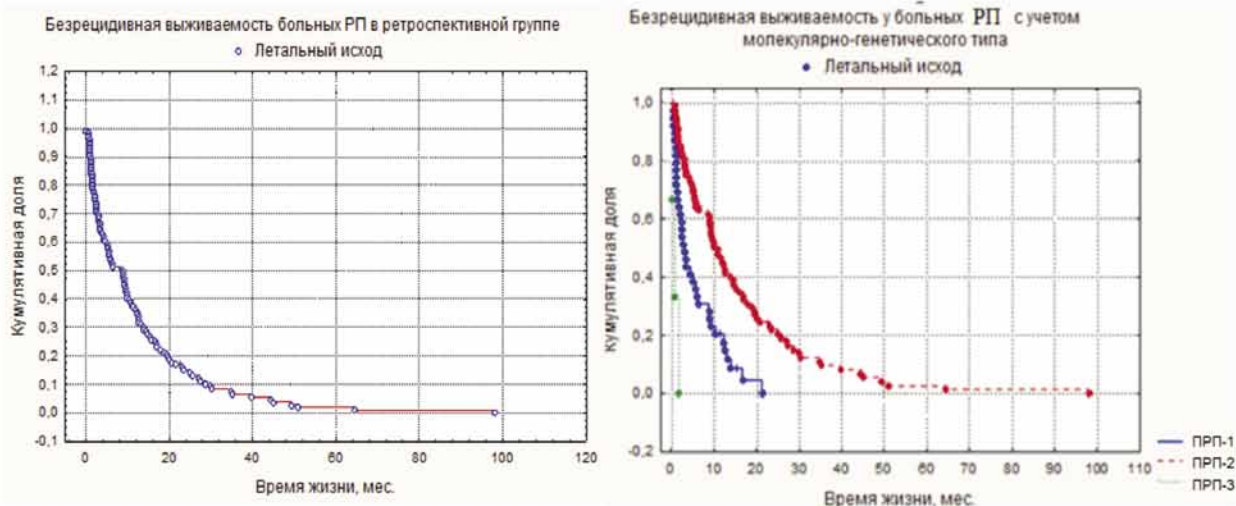


Рис. 5. Безрецидивная выживаемость больных ПРП: а) без учета молекулярно-генетического подтипа опухоли; б) с учетом молекулярно-генетического подтипа опухоли

Кривая Каплана-Мейера безрецидивной выживаемости больных ПРП отражена на рис. 5. Медиана показателя кумулятивной доли безрецидивного выживания составила 8.77 мес. Нижний квартиль (25%) соответствовал 2.19 мес., а верхний квартиль (75%) — 16.6 мес. Средняя величина безрецидивной выживаемости в общем по группе составила 11.7±1.3 мес.

Безрецидивная выживаемость больных ПРП при молекулярно-генетическом подтипе ПРП-3 имела наихудшие показатели (медиана 0.7 мес.). Также низкие значения медианы безрецидивной выживаемости отмечали и для больных с подтипом ПРП-1 (медиана 3.0 мес.). При молекулярном подтипе ПРП-2 медиана безрецидивной выживаемости имела наибольшую величину — 9.9 мес.

Следовательно, молекулярно-генетические подтипы ПРП-3 и ПРП-1 сопряжены с меньшими значениями безрецидивной выживаемости больных ПРП (с2=21.5, p=0.00002) (табл. 3).

Таблица 3. Временные и частотные характеристики безрецидивной выживаемости больных РП в зависимости от молекулярно-генетического типа

Тип	Me	M	S	Число умерших	ОВ	N
ПРП-1	3.0	5.6	5.5	37	94.9	39
ПРП-2	9.9	15.0	16.3	78	95.1	82
ПРП-3	0.7	0.9	1.0	3	100	3
с2, р	с2=21.5, р=0.00002					

Обсуждение результатов исследования

В результате исследования 124 пациентов было верифицировано 3 молекулярно-генетических подтипа плоскоклеточного рака пищевода:

ПРП-1 был установлен у 31.5%, ПРП-2 у 66.1% и ПРП-3 у 2.4% больных. Полученное процентное распределение по подтипам ПРП в исследуемой популяции несколько отличается от описанного в литературе: 56%, 40% и 4% соответственно [3], что может являться как следствием малого объема выборки, так и уникальной характеристикой данной популяции.

Для ПРП первого типа (ПРП-1) данной популяции характерно изменение копийности генов *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *CUL3*, *ATG7* и *VGLL4* в опухолевых клетках относительно нормальных, а также SNP в гене *NFE2L2* (с.85G>A). Наиболее сильно выражено изменение копийности генов *SOX2*, *TP63* и *YAP1* (увеличение более чем в 4 раза).

SOX2 является фактором транскрипции, который необходим для поддержания самообновления недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. При плоскоклеточных опухолях часто увеличивается копийность генов, расположенных в области 3q26.3, где и расположен *SOX2*, что характеризует его как онкоген. *SOX2* является ключевым фактором, регулирующим многие гены, участвующие в развитии опухоли [8]. Гиперэкспрессия гена *SOX2* встречается при раке предстательной железы и колоректальном раке [9].

TP63, в зависимости от изоформы, может действовать как ДНК-связывающий транскрипционный активатор или репрессор. Так изоформа 2 активирует транскрипцию *RIPK4* и в сочетании с *TP73* участвует в иницировании *TP53*-зависимого апоптоза в ответ на активацию онкогенов. Также *TP63* оказывает влияние на сигнальный путь Notch, активируя *JAG1* и *JAG2*, участвует в регуляции морфогенеза эпителия [10].

YAP1 связан с семейством транскрипционных факторов *TEAD*, обладает пролиферативной и

онкогенной активностью, регулируя активность генов, которые способствуют делению клеток и ингибируют апоптоз [11].

Патогенная миссенс мутация в гене *NFE2L2* (с.85G>A, замена G на A в 85 позиции) нарушает выполнение функций данного транскрипционного фактора (PolyPhen-2 v2.2 score = 0.999), регулирующего экспрессию антиоксидантных ферментов.

Кодируемый геном *CUL3* белок играет важную роль в полиубиквитинизации и последующей деградации специфических белковых субстратов в качестве основного компонента и скэффолд-белка комплекса убиквитинлигазы E3[12]. *ATG7* кодирует важный белок для деградации клеток и субклеточных структур во время аутофагии. *ATG7* помогает убиквитиноподобным (UBL)-белкам нацеливаться на их мишени, является регулятором сборки аутофагосом. [13]

Согласованная регуляция множества сигнальных путей имеет решающее значение для гомеостаза ткани и онкогенеза. Наблюдаемое повышение копийности генов *SOX2* и *YAP1* при ППП-1 приводит к повышению пролиферативной активности тканей. Для подавления чрезмерного роста тканей и образования опухолей важно ограничивать онкогенную активность *YAP*. Эту функцию, в норме, выполняет *VGLL4*, напрямую конкурируя с *YAP* за связывание TEAD. Экспрессия *VGLL4* значительно снижена в образцах колоректального рака и рака желудка, и связана с выживаемостью пациентов [14]. В нашем исследовании копийность гена *VGLL4* также снижена, что потенциально может нарушать ингибирующее действие на *YAP1*. Так же при данном подтипе ППП нарушена регуляция апоптоза, экспрессии антиоксидантных ферментов и системы убиквитин-зависимого протеолиза.

Для ППП-2 характерно изменение копийности генов *CDK6* и *KDM6A*, а также SNP в генах *NOTCH1* (с.1379C>T и с.1451G>T) и *ZNF750* (с.414C>A и с.1621G>A).

CDK6 (Cell division protein kinase 6) обеспечивает переключение между фазами клеточного цикла G1 и S, в ответ на внешние сигналы (например, факторы роста) [15, 16].

Потеря нормального контроля клеточного цикла является первым шагом к развитию различных опухолей. Изменение копийности *CDK6* может прямо или косвенно повлиять на такие параметры как клеточный метаболизм, пролиферация, ангиогенез. Например, нарушение функционирования *CDK6* играет важную роль при злокачественных опухолях лимфоидных тканей, увеличивая ангиогенез [17]. Белок p53 является одним из факторов транскрипции, который инициирует синтез белка p21, являющегося ингибитором комплекса *CDK6*, что приводит к

остановке клеточного цикла в периоде G1 и G2. Клетка, у которой повреждена ДНК, не вступает в S-фазу. При мутациях, приводящих к нарушению функции белка p53, или при увеличении концентрации продукта гена *CDK6* (из-за увеличения копийности в данном случае), блокады клеточного цикла не происходит, что приводит к появлению мутантных клеток, большая часть из которых нежизнеспособна, другая — дает начало злокачественным клеткам.

KDM6A участвует в регуляции клеточного метаболизма, за счет деметилирования остатков лизина в гистонах, в частности H3K27, что снижает уровень или полностью снимает репрессию генов, в том числе ассоциированных с сигнальным путем p53 [17]. Соответственно, наблюдаемое снижение копийности гена *KDM6A* приводит к нарушению нормального процесса деметилирования, и часть генов, которые в норме были бы активны остаются репрессированными, например, p53.

Ген *NOTCH1* кодирует трансмембранный белок, входящий в семейство Notch. Белки семейства Notch регулируют реализацию программ дифференцировки, пролиферации и апоптоза. *NOTCH1* участвует в ангиогенезе; отрицательно регулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и ангиогенное прорастание.

Notch-зависимые сигнальные пути регулируют пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, индукцию неоангиогенеза, метастазирование, изменение свойств стромальных фибробластов, формирование преметастатических ниш и т. д. По-видимому, активация сигнального пути Notch может отвечать и за приобретение стромальными клетками, в частности опухоль-ассоциированными фибробластами, способности стимулировать рост и инвазию многих опухолей эпителиального происхождения. Принимая во внимание, с одной стороны, роль сигнального пути Notch в этих процессах, а с другой — его активное участие в коммуникации различных типов клеток и поддержании так называемых преметастатических ниш, можно предположить, что этот сигнальный каскад проявляет как опухоль-промотирующую, так и опухоль-супрессирующую активность, причем в пределах одной и той же опухоли, в зависимости от состояния клетки и ее микроокружения. Способность сигнального пути Notch выступать в качестве онкогена или проявлять свойства опухолевого супрессора зависит не только от гистогенетического типа экспрессирующих его клеток, но и от их микроокружения [19].

До 75% мутаций генов *NOTCH* при плоскоклеточных опухолях являются инактивирующими [20]. Однако, биологический эффект SNP в гене *NOTCH1* (с.1379C>T, замена C на T в 1379 позиции и с.1451G>T замена G на T в 1451 по-

зиции) не описан [21], при помощи PolyPhen-2 v2.2 показана высокая их патогенность и повреждающий эффект на функцию белка.

Транскрипционный фактор ZNF750 участвует в дифференцировке эпидермиса на терминальной стадии — активирует экспрессию генов поздней эпидермальной дифференцировки, связывается с промотором гена KLF4 и способствует повышению его экспрессии. ZNF750 контролирует эпителиальный гомеостаз, регулируя гены эпидермальной дифференцировки, что подчеркивает роль его патогенных мутаций в развитии ППП. Показано, что ZNF750 часто мутирован и слабо экспрессируется в человеческих плоскоклеточных опухолях пищевода, что в свою очередь связывают с плохой выживаемостью пациентов. Кроме того, ZNF750 эффективно подавляет миграцию клеток, напрямую ингибируя активацию LAMC2. Таким образом, в норме ZNF750 можно охарактеризовать как важнейший специфичный для плоскоклеточного опухолевый супрессор [22].

По данным PolyPhen-2 v2.2 SNP в гене ZNF750 (с.414C>A и с.1621G>A) обладают разным эффектом на функцию соответствующего белка. Так ZNF750 (с.414C>A) является нонсенс мутацией, терминирующей синтез белка и элиминирующей его функции. SNP ZNF750 (с.1621G>A) является миссенс мутацией с нейтральным эффектом на функцию белка.

Таким образом, при ППП-2 происходят изменения, затрагивающие регуляцию клеточного цикла, ангиогенеза и клеточной миграции (рис. 6). Наблюдаемые молекулярные изменения отличаются от изменений при ППП-1, хотя и затрагивают схожие биологические функции кле-

ток. В молекулярно-генетическом плане, ППП-2 является более стабильным и менее агрессивным (кол-во CNV и патогенность SNP) по сравнению с ППП-1, что вероятно и объясняет более высокие показатели выживаемости пациентов.

Для ППП-3 характерно изменение копийности гена *ATG7* и SNP в генах *SMARCA4* (р.Q758*, с.2272C>T) и *KMT2D* (Q5170* , с.15508C>T).

Основные функции гена *ATG7* были описаны ранее. При ППП-3 так же, как и при ППП-1, наблюдается снижение копийности данного гена, что ассоциировано с нарушением убиквитин-зависимого внутриклеточного протеолиза.

SNP Q758* и Q5170* в генах *SMARCA4* и *KMT2D* соответственно являются онкогенными мутациями, вызывают потерю функции соответствующих белков [23].

Кодируемый *SMARCA4* (ATP-dependent chromatin remodeler, BRG1) белок является частью большого АТФ-зависимого комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF, который необходим для активации транскрипции репрессированных генов. Кроме того, этот белок может связывать BRCA1 и регулировать экспрессию онкогенного белка CD44. В опухолях BRG1 (*SMARCA4*) является наиболее часто мутирующей АТФазой ремоделирующей хроматин [24]. Мутации происходят в высоко консервативных последовательностях АТФазы, например, в ДНК-связывающем участке. Эти мутации изменяют регуляторную функцию белка [25]. Также показано, что *SMARCA4* взаимодействует с опухолевым супрессором p53 и необходим для активации p53-опосредованной транскрипции [26].

KMT2D (Histone-lysine N-methyltransferase 2D) является основной метилтрансферазой ги-

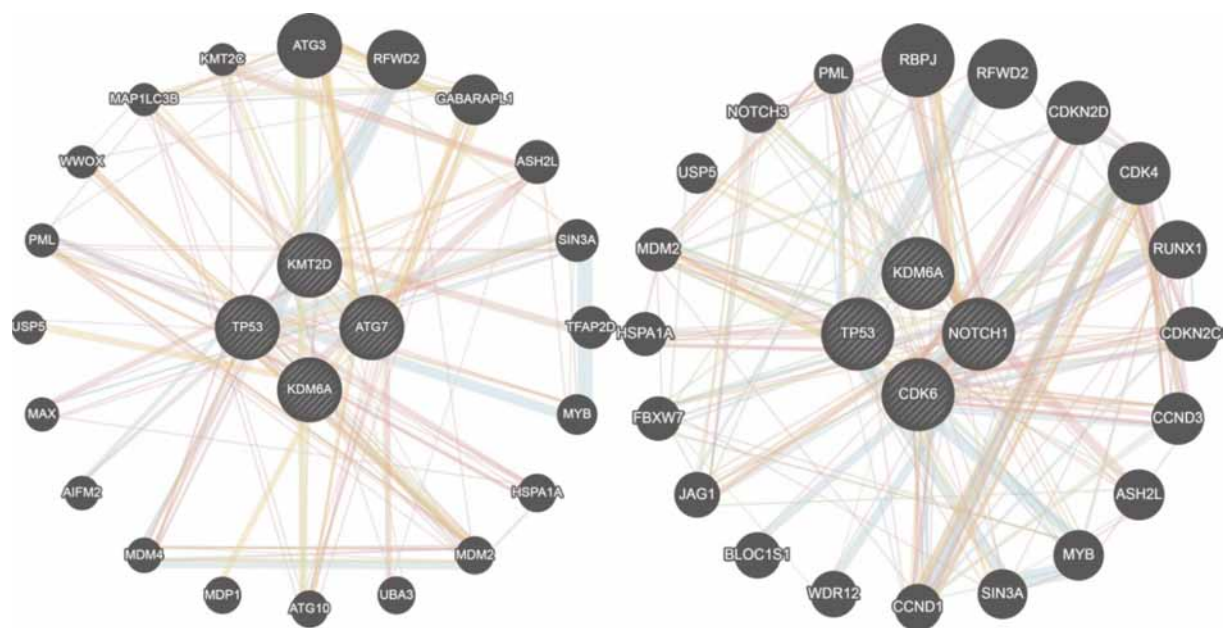


Рис. 6. Сеть генетических взаимодействий при ППП: 1) ППП-1 (слева), 2) общие сигнальные пути для ППП-1, ППП-2 и ППП-3 (справа)

стона НЗК4 и необходим для дифференцировки клеток и эмбрионального развития [27]. Он играет критическую роль в регуляции судьбы клетки (деления или апоптоза), метаболизма и подавления роста опухоли [28]. Мутации в *KMT2D* связаны с различными формами рака [29].

KMT2C и *KMT2D* вместе с *NCOA6* действуют как соактиваторы p53, и необходимы для эндогенной экспрессии p53 в ответ на агент, повреждающий ДНК [30]. Нокаут *KMT2D* у мышей отрицательно влияет на экспрессию генов-супрессоров опухолей *TNFAIP3*, *SOCS3* и *TNFRSF14* [31]. И наоборот, дефицит *KMT2D* в некоторых опухолевых клеточных линиях приводит к снижению пролиферации [32]. Таким образом, *KMT2D* может оказывать различное влияние на развитие опухоли в разных типах клеток и при разных условиях.

Сочетание данных молекулярных изменений, нарушающих нормальное функционирование опухолевых супрессоров, очевидно является причиной наихудших показателей выживаемости пациентов при подтипе ПРП-3.

Заключение

Проведенный молекулярно-генетический анализ выявил у больных ПРП популяции Юга России SNP (*NFE2L2* (с.85G>A), *NOTCH1* (с.1379C>T), *NOTCH1* (с.1451G>T), *ZNF750* (с.414C>A), *ZNF750* (с.1621G>A), *SMARCA4* (с.2272C>T), *KMT2D* (с.15508C>T) и CNV (*CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6*, *KDM6A*) генов, описанные ранее для популяций Восточной Европы, Канады и США. На основании дифференциальных отличий по SNP и CNV этих генов было верифицировано 3 молекулярно-генетических подтипа плоскоклеточного рака пищевода: ПРП-1 был установлен у 31.5%, ПРП-2 у 66.1% и ПРП-3 у 2.4% больных. При этом у больных РП с молекулярно-генетическим подтипом ПРП-2 установлены более высокие показатели выживаемости по сравнению с ПРП-1 и ПРП-3. Различия выживаемости между тремя группами было статистически значимым ($p=0,00001$). Таким образом, определение молекулярно-генетического подтипа ПРП является перспективным для прогноза течения данного заболевания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xiong T, Wang M, Zhao J, et al. An esophageal squamous cell carcinoma classification system that reveals potential targets for therapy. *Oncotarget*. 2017;8(30):49851-49860.

2. Кит О.И., Водолажский Д.И., Базаев А.Л., Златник Е.Ю., Колесников Е.Н., Трифанов В.С., Харин Л.В., Кутилин Д.С. Молекулярные маркеры плоскоклеточного рака пищевода // Современные проблемы науки и образования. — 2017. — № 5. [Kit OI, Vodolazhsky DI, Bazaev AL, Zlatnik EY, Kolesnikov EN, Trifanov VS, Kharin LV, Kutilin DS. Molecular markers of esophageal squamous cell carcinoma. *Modern problems of science and education*. 2017; 5. (In Russ.) Доступно по: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26709>. Ссылка активна на 12.01.2019.
3. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature*. 2017; 541(7636): 169-175.
4. Кутилин Д.С., Енин Я.С., Петрусенко Н.А., Водолажский Д.И. Изменение копийности генетических локусов при малигнизации тканей легкого // Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 6. [Kutillin DS, Enin YS, Petrusenko NA, Vodolazhsky DI. Copy number variation of genetic loci with malignization of lung tissue. *Modern problems of science and education*. 2016; 6. (In Russ.); Доступно по: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25994>. Ссылка активна на 12.01.2019.
5. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генетических локусов при раке желудка // Молекулярная биология. — 2015. — Т. 49, № 4. — С. 658-666. [Kit OI, Vodolazhsky DI, Kutilin DS, Gudueva EN. Changes in the number of copies of genetic loci in gastric cancer. *Molecular Biology*. 2015; 49(4): 658-666. (In Russ.)] doi 10.7868/S0026898415040096.
6. cBioportal. Available from: <http://www.cbioportal.org>.
7. TCGA (The Cancer Genome Atlas). Available from: <https://tcga-data.nci.nih.gov>, <https://portal.gdc.cancer.gov>.
8. Mukhopadhyay A, Berrett KC, Kc U, Clair PM, Pop SM, Carr SR, Witt BL, Oliver TG. Sox2 cooperates with Lkb1 loss in a mouse model of squamous cell lung cancer. *Cell Reports*. 2014;8 (1): 40-9. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.036
9. Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K, Yuasa Y. Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133 (4): 263-9.
10. Deutsch GB, Zielonka EM, Coutandin D, Weber TA, Schäfer B, Hannewald J, Luh LM, Durst FG, Ibrahim M, Hoffmann J, Niesen FH, Sentürk A, Kunkel H, Brutschy B, Schleiff E, Knapp S, Acker-Palmer A, Grez M, McKeon F, Dötsch V. DNA damage in oocytes induces a switch of the quality control factor TAp63α from dimer to tetramer. *Cell*. 2011; 144 (4): 566-7.
11. Zhao B, Kim J, Ye X, Lai ZC, Guan KL. Both TEAD-binding and WW domains are required for the growth stimulation and oncogenic transformation activity of yes-associated protein. *Cancer Research*. 2009; 69 (3): 1089-98.
12. Wimuttisuk W, Singer JD. The Cullin3 Ubiquitin Ligase Functions as a Nedd8-bound Heterodimer. *Mol Biol Cell*. 2007; 18 (3): 899-909.
13. Xiong J. Atg7 in development and disease: panacea or Pandora's Box? *Protein Cell*. 2015;6(10):722-34.
14. Jiao S, et al. VGLL4 targets a TCF4-TEAD4 complex to coregulate Wnt and Hippo signalling in colorectal cancer. *Nat. Commun*. 2017; 8, 14058 doi: 10.1038/ncomms14058.
15. Kollmann K, Heller G, Schneckenleithner C, Warsch W, Scheicher R, Ott RG, Schäfer M, Fajmann S, Schleder

- M, Schiefer AI, Reichart U, Mayerhofer M, Hoeller C, Zöschbauer-Müller S, Kerjaszki D, Bock C, Kenner L, Hoefler G, Freissmuth M, Green AR, Moriggl R, Busslinger M, Malumbres M, Sexl V. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2013; 24 (2): 167-81.
16. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013; 14 (8): 518-28.
 17. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010; 11 (3): 220-28.
 18. Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhata R. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science*. 2007; 318 (5849): 447-50.
 19. Новикова М.В., Рыбко В.А., Хромова Н.В., Фармаковская М.Д., Копнин П.Б. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза.// *Успехи молекулярной онкологии*. — 2015. — Т.2. — С.30-42. [Novikova M.V., Rybko V.A., Khromova N.V., Farmakovskaya M.D., Kopnin P.B. The role of Notch pathway in carcinogenesis. *Advances in molecular oncology*. 2015; 2:30-42. (In Russ).] doi: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-30-42
 20. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1447-56.
 21. South AP, Purdie KJ, Watt SA, et al. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(10):2630-2638/
 22. Hazawa M, Lin D-C, Handral H, et al. ZNF750 is a lineage-specific tumour suppressor in squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2017; 36: 2243-2254.
 23. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med*. 2015;21(10):1190-8.
 24. Hodges C, Kirkland JG, Crabtree GR. The Many Roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF Complexes in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016; 6 (8): a026930.
 25. Stanton BZ, Hodges C, Calarco JP, Braun SM, Ku WL, Kadoch C, Zhao K, Crabtree GR. Smarca4 ATPase mutations disrupt direct eviction of PRC1 from chromatin. *Nature Genetics*. 2017; 49 (2): 282-288.
 26. Lee D, Kim JW, Seo T, Hwang SG, Choi EJ, Choe J. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (25): 22330-7.
 27. Lee JE, Wang C, Xu S, Cho YW, Wang L, Feng X, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *eLife*. 2013; 2: e01503.
 28. Kim DH, Kim J, Kwon JS, Sandhu J, Tontonoz P, Lee SK, Lee S, Lee JW. Critical Roles of the Histone Methyltransferase MLL4/KMT2D in Murine Hepatic Steatosis Directed by ABL1 and PPARγ2. *Cell Reports*. 2016; 17 (6): 1671-1682.
 29. Rao RC, Dou Y. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nature Reviews*. 2015; *Cancer*. 15 (6): 334-46.
 30. Lee J, Kim DH, Lee S, Yang QH, Lee DK, Lee SK, Roeder RG, Lee JW. A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106 (21): 8513-8.
 31. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, Pan H, Jiang Y, Zhao C, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nature Medicine*. 2015; 21 (10): 1199-208. doi:10.1038/nm.3943.
 32. Kim JH, Sharma A, Dhar SS, Lee SH, Gu B, Chan CH, Lin HK, Lee MG. UTX and MLL4 coordinately regulate transcriptional programs for cell proliferation and invasiveness in breast cancer cells. *Cancer Research*. 2014;74 (6): 1705-17.

Поступила в редакцию 29.01.2019 г.

E.N. Kolesnikov, A.Yu. Maksimov, O.I. Kit, D.S. Kutilin

Dependence of overall and relapse-free patients survival from molecular genetic subtype of esophageal squamous cell cancer

Rostov Research Institute of Oncology

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is a group of heterogeneous tumors with a different prognosis. In recent years, various molecular signatures of ESCC have been identified, which are different in different populations. The aim of the study was the molecular typing of ESCC patients in southern Russia and the assessment of patient survival, taking into account the identified tumor molecular genetic subtype. The material for the study was the sections of FFPE-blocks of 124 patients with ESCC. Tumor and non-tumor esophagus cells isolation was carried out by laser microdissection with contactless capture. 248 DNA samples were extracted from the cells by the phenol-chloroform method. For molecular typing of ESCC, the relative copy number variation (CNV) of 8 genes (*CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6*, *KDM6A*) was determined by Real-Time qPCR and 7 single nucleotide polymorphisms (SNP) (*NFE2L2* (c.85G> A), *NOTCH1* (c.1379C> T), *NOTCH1* (c.1451G> T), *ZNF750* (c.414C> A), *ZNF750* (c.1621G> A), *SMARCA4* (p.Q758 *, c.2272C> T), *KMT2D* (Q5170 *, c.15508C> T)) were determined by the method of Sanger direct sequencing. During the study, in ESCC patients of the Southern Russia population identified SNP in genes *NFE2L2*, *NOTCH1*, *SMARCA4*, *KMT2D* and CNV of genes *CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6* and *KDM6A*, earlier described for populations of Eastern Europe, Canada and the USA. Three molecular genetic subtypes of ESCC were verified, based on the differences in SNP and CNV of these genes: ESCC1 was verified in 31.5%, ESCC2 in 66.1%, and ESCC3 in 2.4% of patients. At the same time, higher survival rates were established in ESCC patients with the molecular genetic subtype ESCC2, as compared with ESCC1 and ESCC3. Differences in survival between the three groups were statistically significant (p = 0.00001). Thus, the determination of the molecular genetic subtype of ESCC is an important approach to improve the prediction of the course of this disease and the possibility of adjusting the appropriate therapy.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; molecular genetic subtype; gene copy number variation; single nucleotide polymorphisms; laser microdissection; survival