

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Курмышкина О.В., Богданова А.А., Спасова А.П., Ковчур П.И., Волкова Т.О.

RNA-SEQ В ИЗУЧЕНИИ ВИРУС-АССОЦИИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ: РАК ШЕЙКИ МАТКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» (ПетрГУ), 185910, Петрозаводск, Россия

За последние несколько лет секвенирование нового поколения и его приложения заняли центральное место в арсенале аналитических методов, используемых при изучении механизмов индукции и прогрессии злокачественных образований. Среди разнообразных экспериментальных возможностей высокопроизводительного секвенирования большое значение имеет РНК-секвенирование (RNA-Seq), позволяющее исследовать высшие уровни регуляции экспрессии генома, которые определяют молекулярный фенотип клеток в составе опухоли. Существенная доля современных работ, проводимых с помощью метода RNA-Seq, представляет собой пан-раковые интегрированные исследования, в которых особое внимание уделяется группе вирус-ассоциированных опухолей, в том числе папилломавирус-зависимому раку шейки матки.

В обзоре обобщены результаты исследований, опубликованных в мировой литературе за 2017–2019 гг., проведенные на клиническом биоматериале с использованием RNA-Seq в применении к раку шейки матки. В статье рассматриваются новые факты по таким актуальным проблемам онкологии, как геномная и транскриптомная нестабильность, неоантигенная нагрузка, клеточная и молекулярная гетерогенность, эпигенетическая регуляция, противоопухолевый и противовирусный иммунный ответ, хроническое воспаление, иммунное истощение, фенотипическая пластичность и резистентность опухолевых клеток. Весь спектр вопросов, активно обсуждаемых в публикациях, систематизирован согласно 3 уровням: 1) «молекулярный», 2) «клеточный», 3) «организменный».

Представленные в статье сведения убедительно говорят о том, что широкое применение технологии RNA-Seq для анализа первичных опухолей человека действительно способствовало переходу на новый уровень понимания механизмов канцерогенеза и появлению новых перспектив в лечении онкозаболеваний с использованием таргетной и иммунотерапии.

Ключевые слова: канцерогенез, молекулярные механизмы; РНК-секвенирование; транскриптом; метастазирование; противоопухолевый иммунный ответ; микроокружение; обзор.

Для цитирования: Курмышкина О.В., Богданова А.А., Спасова А.П., Ковчур П.И., Волкова Т.О. RNA-Seq в изучении вирус-ассоциированных опухолей: рак шейки матки (обзор литературы). *Российский онкологический журнал*. 2019; 24 (1–2): 45–55. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2019-24-1-2-45-55>.

Для корреспонденции: Волкова Татьяна Олеговна, доктор биологических наук, профессор, директор Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ, 185910, Петрозаводск, Россия. E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Kurmyshkina O.V., Bogdanova A.A., Spasova A.P., Kovchur P.I., Volkova T.O.

RNA-SEQ IN THE STUDY OF VIRUS-ASSOCIATED TUMORS: CERVICAL CANCER (REVIEW)

Petrozavodsk State University (PetrSU), 185910, Petrozavodsk, Russia

For the last few years Next Generation Sequencing technique and its applications has took the leading position in the arsenal of analytical methods that are used for studying the mechanisms of neoplastic progression. Among various experimental opportunities Next Generation Sequencing provides, RNA-sequencing (RNA-Seq) is of great importance as it makes possible unraveling the highest levels of genome expression regulation, which define the molecular phenotype of cells in composition of a tumor. Considerable amount of current studies carried out with the use of RNA-Seq method are designed as pan-cancer integrated research, in which special attention is paid to virus-associated tumors, including papillomavirus-dependent cervical cancer. This review paper summarizes the results of RNA-Seq studies published world-wide within 2017–2019 years and carried out using clinical samples from cervical cancer patients. New facts concerning such hot topics as genomic and transcriptomic instability, neoantigen load, cellular and molecular heterogeneity, tumor epigenetics, antitumor and antiviral immune response, chronic inflammation, immune exhaustion, phenotypic plasticity and tumor cell resistance, are considered. The whole spectrum of issues that are actively discussed in published literature is systematized according to three levels of organization: «molecular», «cellular» and «organismal». The findings reviewed in the paper convincingly illustrate that wide usage of RNA-Seq technology for profiling primary tumors does facilitate moving to a new level of our understanding of the mechanisms of carcinogenesis and emergence of new directions in cancer treatment, namely targeted and immune-therapy.

Key words: carcinogenesis; RNA-sequencing; transcriptome; molecular mechanisms; metastasis; antitumor immune response; microenvironment; review.

For citation: Kurmyshkina O.V., Bogdanova A.A., Spasova A.P., Kovchur P.I., Volkova T.O. RNA-Seq in the study of virus-associated tumors: cervical cancer (review). *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2019; 24 (1–2): 45–55. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2019-24-1-2-45-55>.

For correspondence: Tatyana O. Volkova, MD, PhD, Dr. Sci. Biol., Professor, Director of the Institute of High Biomedical Technologies of PetrSU, 185910, Petrozavodsk, Russia. E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Information about authors:

Bogdanova A.A. <https://orcid.org/0000-0002-4433-3283>
Kurmyshkina O.V. <https://orcid.org/0000-0002-0554-8038>
Spasova A.P. <https://orcid.org/0000-0002-2797-4740>
Kovchur P.I. <https://orcid.org/0000-0002-7982-4971>
Volkova T.O. <https://orcid.org/0000-0002-4606-0784>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant N 17-15-01024).

Received 25 October 2019

Accepted 06 November 2019

Развитие злокачественной опухоли представляет собой один из альтернативных вариантов реализации регуляторных механизмов, заложенных в клеточном геноме. Согласно современным исследованиям, ведущая роль в реализации разнообразных клеточных программ (пролиферации, дифференцировки, смерти, миграции и т.п.) принадлежит процессам, связанным с различными видами РНК и их обменом, которые формируют клеточный транскриптом. Известно, что фенотип раковой клетки ассоциирован с множеством особенностей протекания данных процессов, поэтому анализ опухолевого транскриптома имеет не только общебиологическое, но и медицинское значение. Изучение механизмов регуляции транскриптома во всем его многообразии, установление причинно-следственных связей между изменениями на уровне генома и на уровне фенотипа в клетках опухоли получили мощный толчок с разработкой приложений высокопроизводительного секвенирования, в том числе РНК-секвенирования (RNA-Seq), miRNA-Seq, ChIP-Seq и других, развитием биоинформатических методов обработки и интеграции больших массивов данных и началом их широкого использования. Большие усилия, объединённые в рамках The Cancer Genome Atlas (TCGA) консорциума, были направлены на секвенирование и анализ тысяч образцов наиболее часто встречающихся типов рака с использованием различных платформ. К настоящему времени база данных TCGA предоставляет RNA-Seq профили и связанную с ними клиническую информацию по 33 типам (>20 000 образцов) рака, поэтому можно наблюдать, как постепенно обращение к базе данных TCGA входит в «исследовательский стандарт» при изучении какого-либо молекулярного маркера или процесса.

Пан-раковый анализ – новая ступень, на которую перешли исследования в течение последних 3–5 лет. В сочетании с интегрированным (мульти-«омиксным») подходом пан-раковый RNA-Seq анализ транскриптома позволяет, с одной стороны, глубже понять общие закономерности канцерогенеза, что важно для разработки единых стратегий лечения; с другой стороны, пан-раковый анализ даёт возможность выявить факторы, определяющие многообразие вариантов развития и прогрессии рака, что важно с точки зрения дифференциальной диагностики и персонализированного подхода. Так, например, на основе RNA-Seq данных были недавно описаны пан-раковый метаболический атлас [1] и иммунный атлас [2]. Некоторые пан-раковые исследования останавливаются на более подробном рассмотрении определённой группы онкозаболеваний, объединённых какой-либо характеристикой. Например, были охарактеризованы интегрированные молекулярные

портреты (включая транскриптом) плоскоклеточных карцином различной органной принадлежности – лёгкого, пищевода, головы и шеи, шейки матки, мочевого пузыря [3]; портреты опухолей женской репродуктивной системы (Pan-Gyn профили) – рака яичников, тела и шейки матки; молочной железы [4]; портреты вирус-ассоциированных опухолей – головы и шеи, шейки матки, печени, желудка, толстой и прямой кишки, уротелиального рака мочевого пузыря [5].

Ещё один уровень усложнения транскриптомных исследований, проводимых в настоящее время, связан с развитием новых биоинформатических алгоритмов для качественного и количественного анализа клеточного состава образца ткани на основе его суммарного RNA-Seq профиля. Данные алгоритмы значительно расширяют возможности изучения опухолевого микроокружения, в частности, иммунного микроокружения, и поэтому получают всё более широкое распространение [6]. Например, алгоритм CIBERSORT основан на математической операции деконволюции, или восстановления, популяционного состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток (В-, Т-лимфоцитов, естественных киллеров, макрофагов, тучных клеток) с использованием референсной матрицы, представленной специфически «отпечатками», или сигнатурами, более 20 различных лейкоцитарных популяций [7]. Применение CIBERSORT позволило описать паттерны иммунного инфильтрата для более чем 30 типов рака (см. далее). Безусловно, даже такие сложные подходы не лишены недостатков, однако, ведутся исследования, направленные на их исправления [8]. Например, если в качестве «обучающих» (в терминологии машинного обучения) выборки, как правило, использовались RNA-Seq профили изолированных популяций клеток периферической крови, то в настоящее время разрабатываются сигнатуры различных популяций тканевых лейкоцитов, в том числе внутриопухолевых [9]. Наконец, кроме субпопуляционного состава, RNA-Seq позволяет устанавливать полный антигенный репертуар Т- и В-клеточных рецепторов (см. далее).

Особое внимание в мульти-«омиксных» исследованиях уделяется вирус-ассоциированным опухолям; их инфекционная природа позволяет устанавливать важные принципы функционирования иммунного микроокружения. По результатам глубокого секвенирования 1/5 часть солидных опухолей можно отнести к группе вирус-ассоциированных онкопатологий, исходя из обнаружения вирусных последовательностей в геноме или вирус-специфических транскриптов; 34 вида вирусов, принадлежащих 5 семействам (*Papillomaviridae*, *Polyomoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*,

Herpesviridae), обнаружены в 7 типах рака [5]. Из них только рак шейки матки (РШМ) на 98,8% ассоциирован с вирусной инфекцией, причем папилломавирус человека (ВПЧ) является наиболее часто встречаемым онковирусом (кроме РШМ, ВПЧ также обнаруживается в 20–25% опухолей головы и шеи и около 7% рака мочевого пузыря). Кроме того, РШМ представляет единственный вид опухолей женской репродуктивной системы, для которого доказана вирусная этиология [10].

В данном обзоре мы останавливаемся на последних достижениях технологии RNA-Seq в применении к образцам РШМ, полученных от пациентов, исключая его клеточные модели, в сравнении с другими опухолями эпителиального происхождения. РШМ рассматривается подавляющим большинством опубликованных пан-раковых исследований, и его можно считать репрезентативным объектом для изучения разных групп проблем. Будучи вызванным инфекционным агентом, РШМ представляет интерес с точки зрения проблем хронического воспаления, иммунного редактирования, иммунного истощения, интерфероновой регуляции. Как онкогинекологический рак, РШМ (совместно с другими опухолями женской репродуктивной системы) важен для понимания гормональной составляющей регуляции канцерогенеза. Как рак эпителиального происхождения, представленный плоскоклеточным и железистым подтипами, он заслуживает внимания с позиции проблем клеточной транс-дифференцировки и миграции, тем более что доступность доклинических стадий РШМ позволяет проследить эволюцию этих свойств с самых ранних этапов канцерогенеза. Наконец обнаружено, что при РШМ могут реализовываться различные глобальные программы канцерогенеза, характерные для разных типов вирус-зависимого и вирус-независимого рака [11, 12].

Впечатляющее количество исследований, посвящённых анализу РШМ с использованием технологии RNA-Seq, опубликовано за последние 3 года. Данный обзор литературы не имел целью строгий метаанализ накопленных данных, тем не менее он представляет попытку их обобщения и систематизации по фундаментальным и прикладным вопросам, которые привлекают наибольшее внимание исследователей и врачей. Поиск публикаций за 2017–2019 гг. производился с помощью библиографической базы PubMed (The National Center for Biotechnology Information) с применением следующих фильтров: «RNA sequencing, cervical cancer», «transcriptome, sequencing, cervical cancer», «integrative (или integrated), sequencing, cervical cancer», «landscape, sequencing, cervical cancer», «molecular profiling, sequencing, cervical cancer», «immune, sequencing, cervical cancer», «The Cancer Genome Atlas, sequencing, cervical cancer», «microenvironment, sequencing, cervical cancer», «pan-cancer, sequencing», «differently expressed genes, sequencing, cervical cancer». В отличие от многих обзоров по проблемам молекулярного портрета той или иной онкопатологии, в представленной статье результаты оригинальных исследований систематизированы не по профилям молекулярных нарушений (геномные aberrации, транскриптом, метилом, протеом и т.п.), а согласно уровням биологической организации: «молекулярный», «клеточный», «организменный», с учётом их

тесной взаимосвязи и взаимной обусловленности. В настоящее время подобный подход является наиболее актуальным.

Молекулярный уровень

Транскриптом является молекулярной характеристикой клетки. Некоторые новые свойства транскриптома клеток РШМ и молекулярные механизмы его регуляции, установленные в последнее время с помощью RNA-Seq, имеют достаточно универсальный характер. К таким общим принципам молекулярной регуляции на уровне транскриптома можно отнести регуляцию РНК-сплайсинга, механизмы контроля экспрессии генома с участием различных классов некодирующих РНК, механизмы реализации изменений структуры генома.

1. Вирус-индуцированный мутагенез: ВПЧ как канцероген. Поиск вирус-специфических последовательностей в опухолевом геноме представляет сложную задачу в первую очередь в связи с высоким риском получения контаминирующих артефактов, поэтому для её решения разрабатываются специальные алгоритмы, протоколы и открытые биоинформатические ресурсы [5, 13]. Более того, непосредственный вклад онковируса в канцерогенез требует отдельного доказательства [5], и для этого необходима информация не столько о присутствии вирусных последовательностей в геноме клетки-хозяина, сколько сведения об их транскрипционной активности, поэтому RNA-Seq в данном случае является наиболее объективным и информативным методом. При RNA-Seq скрининге более 20 видов рака (в сочетании с полногеномным/полноэкзомным секвенированием) с использованием TCGA базы были обнаружены транскрипты 34 видов онковирусов 5 семейств (*Papillomaviridae*, *Polyomoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*) с частотой встречаемости, варьирующей в диапазоне 7,5–98,8%, в 7 типах рака (рак головы и шеи, шейки матки, печени, желудка, толстой и прямой кишки, уротелиальный рак мочевого пузыря), которые составляют примерно пятую часть всех онкозаболеваний [5]. Из них только РШМ на 98,8% ассоциирован с вирусной инфекцией.

Несмотря на то что ВПЧ-отрицательный РШМ составляет менее 2% случаев заболевания, Wu и соавт. провели его RNA-Seq профилирование в сравнении с ВПЧ(+) РШМ, которое вполне ожидаемо подтвердило предположение о том, что ВПЧ(+) и ВПЧ(-) РШМ на геномном и транскриптомном уровнях представляют типы рака, эволюционирующие абсолютно по разным путям [11]. С этой точки зрения заслуживает внимания недавнее исследование, выполненное на основе RNA-Seq, которое показало, что РШМ, ассоциированный с ВПЧ высокого онкогенного риска, также может развиваться через реализацию разных глобальных программ, определяемых вирусом [12]. Образцы ВПЧ(+) РШМ с низким титром ВПЧ (около 16% исследованных случаев) имели больше соматических мутаций, по сравнению с РШМ с высоким титром вируса; кроме того, профили геномной экспрессии и сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл и взаимодействия с межклеточным матриксом, сильно различались между образцами РШМ с низким и высоким титром ВПЧ. Авторы делают вывод о том, что при низком титре ВПЧ играет роль всего лишь триггера, в то время как соматиче-

ские мутации, проходя через раунды клональной селекции, становятся настоящими «драйверами» развития опухоли. Напротив, при высоком титре ВПЧ, посредством своих онкопротеинов, играет ключевую («драйверную») роль в прогрессии РШМ, при этом мутации представляют всего лишь «пассажиры», т. е. следствие активности вируса. С этим различием в молекулярной этиологии может быть связана более высокая радиочувствительность инвазивного РШМ с высоким титром ВПЧ, а также более благоприятный прогноз для обследованных больных [12]. Есть также веские основания полагать, что в значительной мере эта закономерность связана с особенностями иммунного ответа (см. далее). Схожие клинические наблюдения приводятся для ВПЧ(-) и ВПЧ(+) опухолей головы и шеи [14].

Таким образом, несмотря на то, что ВПЧ-ДНК является фактически во всех случаях РШМ, активность его генома может существенно различаться. Vanister и соавт. удалось выявить с помощью скрининга RNA-Seq данных TCGA базы среди ВПЧ-ДНК(+) образцов РШМ наличие около 8% ВПЧ-«неактивных», т. е. образцов, в которых не обнаруживаются ВПЧ-транскрипты (E6/E7) [15]. Биоинформатический анализ показал, что транскриптомный профиль (а также профили метилирования и соматических мутаций) у таких ВПЧ-«неактивных» форм имеет ряд существенных особенностей, в частности, он характеризуется более высокой активностью WNT/ β -катенин- и Sonic Hedgehog-зависимых путей и, наоборот, сниженной экспрессией провоспалительных генов, в том числе генов интерферонового ответа и генов контрольных точек иммунитета (например, TIGIT, CTLA4, PDL1). Кроме того, ВПЧ-«неактивный» вариант РШМ имеет отличительный профиль экспрессии генов устойчивости к различным ингибиторам тирозин-киназ, а также содержит больше несинонимических замен в ключевых протоонкогенах (в том числе TP53, WNT, PI3K) и ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. В целом транскриптом ВПЧ-«неактивного» варианта РШМ имеет много общих черт с ВПЧ-негативными опухолями головы и шеи, поэтому авторы предлагают рассматривать РШМ с «неактивным» ВПЧ как отдельный подтип РШМ, имеющий другой механизм канцерогенеза и, соответственно, требующий других подходов к лечению [15].

2. Экспрессируемые геномные нарушения. RNA-Seq часто используется как косвенный метод идентификации геномных aberrаций, сопровождающих канцерогенез. Во многом это обусловлено необходимостью поиска функционально значимых мутаций, проявляющихся в изменении уровня экспрессии белок-кодирующих генов или свойств самих белков. Для РШМ в целом характерен высокий уровень геномной нестабильности, проявляющейся в большей степени в крупных геномных перестройках, чем в точечных мутациях. Одним из следствий дестабилизации генома является образование химерных (гибридных) транскриптов. Несмотря на то что по РШМ накоплен достаточно большой объём RNA-Seq-данных о химерных транскриптах, достоверно неизвестно, могут ли они быть непосредственно вовлечены в канцерогенез и, соответственно, использованы в качестве мишеней. Большое значение придаётся транскриптам, встречающимся с высокой

частотой, т. к. предполагается, что именно такие химерные гены предоставляют селективное преимущество несущим их клонам. Так, например, по результатам RNA-Seq анализа более 300 образцов плоскоклеточного РШМ, в 4 образцах был идентифицирован химерный FGFR3-TACC3 транскрипт, характеризующийся гиперактивацией киназного домена FGFR [16]. В *in vitro* экспериментах данный транскрипт индуцировал субстрат-независимый рост линии эпителиальных клеток эктоцервикса и секрецию ими воспалительных факторов, а также обеспечивал способность к формированию опухоли при подкожном введении мышам. Поскольку данный вариант транслокации FGFR3 является наиболее часто встречаемым среди плоскоклеточных карцином различной локализации и, кроме того, тесно ассоциирован с мутационным статусом гена PI3CA и чувствительностью к FGFR-ингибиторам, то авторы предполагают, что киназные ингибиторы PI3K/Акт- и FGFR-зависимых путей (многие из которых проходят клинические испытания) могут оказывать синергический эффект при выявлении одновременного носительства FGFR3-TACC3 гена и точечных мутаций в PI3K [16]. Данная работа иллюстрирует важность рационального использования низкомолекулярных киназных ингибиторов, которое при недифференцированном подходе часто сопровождается быстрым формированием резистентности.

Другой практический интерес к экспрессируемым геномным нарушениям связан с профилированием опухоли-специфических неоантигенов, возникших в результате соматических мутаций, которые могут быть распознаны иммунокомпетентными клетками, т. е. быть потенциально иммуногенными [17]. Далеко не все мутации включаются в структуру пептидных нео-эпитопов, поэтому мутационная нагрузка опухоли не идентична её антигенной нагрузке (иммуногенности), которая является важным показателем при оценке возможностей использования Т-клеточной иммунотерапии. С использованием RNA-Seq Qin и соавт. удалось показать, что для РШМ характерна и высокая неоантигенная нагрузка, и высокий уровень экспрессии генов HLA-кластера, необходимых для презентации неоантигенов, а также высокий индекс цитолитической активности (см. далее), отражающий содержание цитотоксических Т-НК-клеток в опухолевом иммунном инфильтрате, что в целом отличает РШМ от иммунологически «холодных» опухолей [17]. Более того, была выявлена взаимосвязь мутационного/неоантигенного профиля с особенностями состава иммунного инфильтрата РШМ; продемонстрировано, что активность целого ряда генов «мастер-регуляторов» (ENO1, FOSB, PA2G4, SOX9, TEAD4, FOXO4, MNT), опосредующих эффекты ВПЧ-онкогенов, направлена на подавление иммунного ответа с участием PD-1/L1, IDO1, LAG3, TGF β , IL10 и, таким образом, на нивелирование потенциальной иммуногенности РШМ.

3. Транскриптомная нестабильность. Если геномная нестабильность уже достаточно давно признана одним из ключевых свойств опухолевой клетки, то активное изучение «транскриптомной нестабильности» в трансформированных клетках стало возможным с развитием методов анализа RNA-Seq данных. Транскриптомная нестабильность в целом является следствием отклонений в регуля-

ции сплайсинга, в том числе мутациями в факторах сплайсинга, и может рассматриваться как глобальный механизм регуляции канцерогенеза. Одним из проявлений транскриптомной нестабильности являются изменения паттерна использования экзонов в ходе транскрипции. Например, известно, что химерные РНК, нехарактерные для нормальных клеток, могут возникать не только как следствие геномных перестроек (транслокаций/делеций), но и в результате межгенного сплайсинга, соответственно, при этом генная структура не изменяется, поэтому геномное или экзомное секвенирование не позволяет идентифицировать такие aberrации [18]. Для РШМ частота встречаемости химерных транскриптов, вызванных геномными перестройками, как правило, не превышает 3%, поэтому они не рассматриваются как ведущий фактор. В противоположность этой статистике, недавно с помощью RNA-Seq для РШМ было описано 15 часто встречающихся (то есть более 10% случаев) химерных транскриптов, причем один из них (LHX6-NDUFA8) детектировался в 60% случаев и, наиболее вероятно, представляет собой продукт межгенного цис-сплайсинга (то есть в данном случае «родительские» гены были расположены на одной хромосоме, разделены только одним геном и транскрибировались с одной цепи со сдвигом рамки считывания) [18].

Кроме различного паттерна использования экзонов, ошибки сплайсинга также можно рассматривать как проявление транскриптомной нестабильности, приводящее к возникновению опухоль-специфических стыков экзонов («неоjunctions») и, соответственно, к синтезу неоантигенов, при отсутствии геномных нарушений в данном локусе. Такие события описаны в пан-раковом исследовании, охватывающем порядка 30 видов опухолей, включая РШМ и другие плоскоклеточные карциномы [19]. Были обнаружены как общие для всех типов рака «неоjunctions», так и специфичные для определённой локализации (гистотипа). Отмечается, что для РШМ, наравне с раком лёгкого и уротелиальной карциномой, реализация транскриптомной нестабильности в форме «неоjunctions» является наиболее характерной.

Нарушение механизмов регуляции сплайсинга проявляется также в изменении экспрессии так называемых кольцевых РНК (*circRNAs*, *circular RNAs*), которые образуются в результате неканонического соединения экзонов и могут функционировать как транскрипционные и посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов. Благодаря замкнутой структуре *circRNAs* очень стабильны и часто рассматриваются как компоненты системы конкурирующих эндогенных РНК. Некоторые из них могут взаимодействовать с РНК-связывающими белками, а некоторые даже содержат открытые рамки считывания. Экспрессия *circRNAs* и их вовлечённость в опухоль-ассоциированные процессы недавно были исследованы с использованием RNA-Seq для РШМ, в частности, были выявлены 6 дифференциально экспрессированных *circRNA*, вовлечённых во взаимосвязи с различными микроРНК-мишенями [20].

4. Эпигенетическая регуляция с участием некодирующих РНК (ncRNA). Изучение экспрессии и регуляторной роли разнообразных классов некодирующих РНК сегодня трудно представить без RNA-

Seq. Профилирование ncRNA в опухолевых образцах в сравнении со здоровыми тканями предоставляет ценную информацию об эпигенетической регуляции канцерогенеза. Всё большее внимание в настоящее время уделяется **длинным некодирующим РНК (lncRNAs, long non-coding RNAs)** и механизмам их действия. Для РШМ недавно описана совокупность 6 lncRNA, ассоциированных с прогрессией РШМ и, в функциональном отношении, вовлечённых в регуляцию дифференцировки кератиноцитов и иммунный ответ [21]. В другом исследовании обнаружены более 40 РШМ-специфичных lncRNA, которые совместно с мРНК и микроРНК (миРНК) образуют единую регуляторную сеть **конкурирующих эндогенных РНК (ceRNAs, competing endogenous RNAs)** [22]. Некоторые из так называемых **длинных межгенных ncRNAs (lincRNAs, long intergenic ncRNAs)**, представляющих подкласс lncRNA, с потенциальными онкогенными свойствами, например, LINC00958, выявлены при РШМ [23]. Эхансерные последовательности генов также могут служить источником белок-некодирующих транскриптов, вовлечённых в канцерогенез. В рамках пан-ракового исследования с помощью RNA-Seq и специально разработанных алгоритмов для РШМ был описан профиль транскрибированных эхансерных последовательностей (**eRNA, enhancer RNA**); выявлены как общие для разных типов опухолей eRNA, так и специфичные для конкретной локализации [24]. Кроме того, установлены транскрипционные факторы, которые могут регулировать биогенез eRNA, а также их гены-мишени и канонические опухолевые сигнальные пути, проанализирована потенциальная клиническая значимость eRNA.

RNA-Seq также является эффективным инструментом для изучения различных классов малых некодирующих РНК, из них **микроРНК (miRNAs, miR)** наиболее подробно охарактеризованы для разных типов рака. Для РШМ сообщается об обнаружении 9 микроРНК, совокупность экспрессии которых позволяет дискриминировать неоплазии тяжёлой степени, которые с высокой вероятностью будут прогрессировать в инвазивный рак, и предшествующие им доброкачественные изменения [25]. В работе [26] предложена панель из 7 микроРНК, дифференциально экспрессированных между ранними (I–II) и поздними (III–IV) стадиями РШМ и, соответственно, функционально связанных с его прогрессией через воздействие на мРНК-мишени Hedgehog-, WNT-, TGFβ-зависимых сигнальных механизмов. Любопытно, что с помощью RNA-Seq было подтверждено существование ВПЧ-кодируемых микроРНК и описан спектр их потенциальных мРНК-мишеней в образцах РШМ [27], что до недавнего времени являлось дискуссионным вопросом. В целом в отношении некодирующих РНК сегодня активно развивается концепция о сетях эндогенных конкурирующих РНК, в которых центральное положение занимают микроРНК, а за связывание с ними конкурируют мРНК и lncRNA; при этом lncRNA рассматриваются как «губки», адсорбирующие на себе различные микроРНК за счёт присутствия в их структуре микроРНК-связывающих элементов, или MRE (miRNA responsive elements).

5. Антигенный репертуар. RNA-Seq в применении к генам T- и B-клеточных рецепторов (ТКР/БКР)

позволяет описать весь антигенный репертуар Т- и В-клеток в составе опухоли, который представляет важный показатель активности противоопухолевого иммунного ответа. Эта возможность обусловлена тем, что ТКР и БКР представляют собой уникальный пример того, как в норме гены могут подвергаться процессам масштабных перестроек и соматической гипермутации, генерирующим бесконечно большое число вариантов их последовательностей, которые далее могут быть клонально амплифицированы в результате клеточного деления. При злокачественных патологиях данные процессы могут претерпевать изменения. Так, в случае РШМ было проведено сравнительное изучение репертуара ТКР и выявлены уникальные ТКР-клонотипы в крови пациенток с IB–IV стадиями инвазивного РШМ и цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН), а также в ткани и сторожевых лимфоузлах пациенток с РШМ IB (N0) стадии [28]. Установлено, что в лимфоузлах разнообразие ТКР выше, чем в соответствующей опухолевой ткани; в кровотоке разнообразие уменьшается в ряду норма – ЦИН – РШМ IB – РШМ>IB, при этом увеличивается частотность определённых ТКР-клонотипов, что может быть связано с клональной экспансией Т-клеток определённой антигенной специфичности или, наоборот, с Т-клеточным «истощением». Была показана положительная взаимосвязь разнообразия ТКР (т. е. числа разных клонотипов) в сторожевых лимфоузлах с прогнозом. Авторы полагают, что часть клонотипов, обнаруженных в лимфоузлах, соответствует эффекторным Т-клеткам памяти, вышедшим из первичной опухоли.

Аналогичным образом из RNA-Seq данных можно экстрагировать информацию о репертуаре БКР, основываясь на установлении последовательностей IgH-гипервариабельных областей. Соответственно, можно делать выводы о клональной В-клеточной экспансии, особенностях переключения изотипов и процессах соматической гипермутации внутри опухоли, механизмах ускользания от иммунных реакций, опосредованных В-клетками (в частности, антителопосредованной цитотоксичности), о взаимосвязях с экспрессией Т- и В-клеточных активационных маркеров. Такое исследование было проведено в рамках пан-ракового анализа на 9000 образцах, представляющих более 30 типов рака, включая РШМ [29].

Клеточный уровень

Безусловно, молекулярный уровень является базовым для любых клеточных процессов; тем не менее, во многих современных исследованиях по РШМ и другим видам рака анализ транскриптома используется не для расшифровки молекулярных механизмов, а для понимания природы межклеточных взаимодействий в составе опухоли и причин, обуславливающих особенности её поведения. Важнейшими фенотипическими особенностями клеток эпителиального рака являются утрата эпителиальной организации, быстрая эволюция и формирование множественной резистентности, приобретение инвазивных свойств, а также способности к «перепрограммированию» фенотипа клеток неэпителиального происхождения, составляющих микроокружение опухоли. В совокупности данные процессы обуславливают высокую клеточную гетерогенность опухоли и её фенотипическую пластичность.

1. Популяционная гетерогенность, опухолевое микроокружение. Проблему клеточной гетерогенности, которая включает в себя представления о прогрессии опухоли через эволюцию опухолевых клонов и существовании стволовых опухолевых клеток, а также вклад иммунного инфильтрата или стромального компонента, можно назвать наиболее комплексной и актуальной. Межклеточные взаимодействия обеспечивают пластичность опухолевых клеток – главное препятствие эффективного лечения. Ряд новых исследований наглядно иллюстрирует информативность метода RNA-Seq в изучении межклеточных взаимодействий и клеточной гетерогенности при развитии солидных опухолей. Методологически большой прогресс в данной области был достигнут с разработкой методов RNA-Seq одиночных клеток – single-cell RNA-Seq (scRNA-Seq) [30]. В целом транскриптомика одиночных опухолевых клеток основана на физической изоляции/разделении клеток, составляющих опухоль, и приготовлении из каждой из них библиотеки для дальнейшего секвенирования, что требует разработки специализированных реагентов, протоколов пробоподготовки, способов сортировки/баркодирования/обогащения клеточных популяций, наконец, специальных приборов. Альтернативный подход к изучению клеточной гетерогенности опирается на «виртуальное», а не физическое, разделение – математическую операцию реконструкции (деконволюции) RNA-Seq профилей целой опухоли (см. далее).

В отношении РШМ проблема гетерогенности опухолевых клеток находится на начальном этапе своего решения. В качестве примера можно привести работу Punt и соавт., которые исследовали транскриптом эпителиальных (EpCAM+) опухолевых клеток и иммунного инфильтрата (CD45+), полученных путём дезинтеграции образцов РШМ и FACS-сортировки клеточной суспензии. Дальнейший дифференциальный RNA-Seq анализ подтвердил активацию генов-регуляторов клеточного цикла и адгезии в опухолевых клетках и регуляторов иммунного ответа, а также лимфоцитарных маркеров в CD45(+) фракции [31].

2. Иммунное микроокружение. Иммунное микроокружение является одной из составляющих общего микроокружения опухоли, однако, ввиду высокой значимости, которую сегодня приобретают разно-образные методы противоопухолевой иммунотерапии, его можно выделить в самостоятельную проблему, тем более, что иммунное микроокружение определяет фактически все «границы» развития опухоли – неоангиогенез, инвазию и метастазирование, чувствительность к лекарственным препаратам. Вирусная природа РШМ и других вирус-зависимых опухолей обуславливает высокую сложность межклеточных взаимоотношений в опухолевом иммунном микроокружении и особый состав иммунного инфильтрата [32]. Как было отмечено выше, новые методы биоинформатики обеспечили существенный прогресс в реконструкции иммунного микроокружения на основе RNA-Seq профилей нативных опухолей [6]. В результате применения алгоритма CIBERSORT к RNA-Seq данным базы TCGA и GEO (Gene Expression Omnibus) были обнаружены существенные различия в относительной представленности 22 субпопуляций инфильтрирующих лейкоцитов

миелоидного и лимфоидного рядов между образцами РШМ и нормальной ткани [33]: выявлены наиболее представленные популяции (CD8 Т-клетки, покоящиеся CD4 Т-клетки памяти, M0/M1/M2 макрофаги), популяции, ассоциированные с высоким риском прогрессии заболевания (активированные НК-клетки, активированные тучные клетки, покоящиеся CD4 Т-клетки памяти, эозинофилы) или, наоборот, с благоприятным прогнозом (активированные CD4 Т-клетки памяти, CD8 Т-лимфоциты, покоящиеся НК-клетки и покоящиеся тучные клетки); продемонстрирована корреляция уровня экспрессии «контрольных иммунных точек» (ко-стимуляторов/ко-супрессоров) с популяционным распределением иммунного инфильтрата, из них 8 маркеров (CD27, TIGIT, ICOS, LAG3, TIM-3, PD-1, CTLA4, CD86) показали прогностическую значимость. В целом полученные Wang и соавт. данные отражают картину хронического воспаления в очаге РШМ и подтверждают развитие иммуносупрессивного микроокружения. RNA-Seq скрининг вирус-ассоциированных опухолей, проведённый в рамках пан-ракового исследования Thorsson и соавт., дополняет эти результаты зависимостью состава иммунного инфильтрата от вирусной нагрузки, в частности, высокая нагрузка ВПЧ обуславливает Th2-сдвиг и низкое содержание M1 макрофагов [2].

С помощью RNA-Seq анализа более 30 видов опухолей был разработан метод расчёта индекса цитолитической активности (CYT) [34]. Этот показатель основывается на относительной экспрессии гранама GZMA и перфорина PRF1 и отражает представленность популяций цитотоксических Т-/НК-клеток в иммунном инфильтрате. Как оказалось, CYT положительно коррелирует с неопластической нагрузкой и, что наиболее интересно, с известными мутациями в ключевых протоонкогенах. Это указывает на то, что эволюция опухоли и развитие иммунорезистентности идёт под высоким селекционным давлением со стороны иммунной системы [35]. CYT индекс сильно варьирует в зависимости от типа рака, при этом РШМ, наравне с раком лёгкого и опухолями головы и шеи, имеет наиболее высокий CYT индекс, в отличие, например, от рака яичников, для которого определяется наиболее низкое значение CYT. Парадоксальная, на первый взгляд, ситуация может быть объяснена тем, что именно в опухолях с высоким CYT иммунный ответ реализуется в высокой степени иммуносупрессии в результате индуцируемого воспаления. Поэтому для РШМ характерны одновременно высокий уровень экспрессии интерферон-зависимых цитокинов (например, CXCL9, CLCL10, CXCL11), которые рекрутируют в очаг неоплазии большое количество цитотоксических клеток, и повышенная экспрессия иммуносупрессорных факторов (в том числе, PDL2, IDO1/2, GM-CSF-R), с помощью которых опухолевые клетки противостоят иммунному ответу [35]. Кроме того, РШМ относится к группе опухолей, для которых высокий CYT наиболее явно связан с высокой частотой неопластических мутаций, что подтверждает нацеленность внутриопухолевых Т-клеток на данные эпитопы. Также РШМ представляет группу, в которой высокий CYT ассоциирован с относительно высокой частотой (12 %) мутаций в локусе MHC I класса и с высокой частотой амплификаций в генах иммунорегуляторов (например, PDL1,

PDL2), что очевидно позволяет опухоли компенсировать высокий CYT [35].

В целом для вирус-позитивных опухолей (не только ВПЧ(+), но также ЭБВ(+)) аденокарциномы желудка и ЦМВ(+)) аденокарциномы кишечника) характерен более высокий уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2, по сравнению с вирус-негативными опухолями тех же локализаций. К этому выводу пришли Сао и соавт., проанализировав порядка 2000 образцов 6 видов вирус-ассоциированного рака с помощью RNA-Seq [32]. При этом механизмы повышения экспрессии PD-L1/PD-L2 для ВПЧ-зависимых опухолей могут быть разные, в частности, при ВПЧ(+)) раке головы и шеи гиперэкспрессия PD-L1/-L2 связана с интеграцией ВПЧ в различные области этих генов (интронные или нетранслируемые участки). В то же время по результатам скрининга 200 образцов РШМ не найдено ни одного случая подобной интеграции; вместо этого наблюдалась высокая частота амплификаций данных генов. Повышенная экспрессия PD-L1, -L2 и других «контрольных иммунных точек» при ВПЧ(+)) РШМ и опухолях головы и шеи была ассоциирована с более высокой экспрессией Т-/В-клеточной «сигнатуры», что указывает на более высокое содержание лимфоцитарного инфильтрата. Однако если для ВПЧ(+)) опухолей головы и шеи такой профиль был ассоциирован с благоприятным прогнозом, то в случае РШМ подобной ассоциации не обнаружено, что ещё раз подчеркивает, что ВПЧ-зависимые опухоли, несмотря на определённую общность, могут эволюционировать по разным механизмам.

3. Внутриэпителиальное развитие и активация инвазии. Механизмы метастазирования. Согласно ступенчатой модели канцерогенеза, эпителиальные опухоли в своём развитии проходят ряд этапов – от доброкачественных изменений через карциному *in situ* к инвазивному росту. Благодаря развитию диагностических методов значительно увеличилась частота выявления наиболее ранних неопластических изменений эпителия шейки матки. Клинические наблюдения показывают, что далеко не все эти изменения трансформируются в инвазивный рак, либо их развитие занимает длительный промежуток времени, что поднимает вопрос о существовании причин (триггеров) смены клеточного фенотипа на инвазивный. Поскольку моделирование *in vitro* длительной эволюции карциномы в пределах границ эпителиального слоя трудноосуществимо, профилирование транскриптома образцов преинвазивных и ранних инвазивных нарушений, полученных в клинических условиях, может существенно помочь в изучении триггерных механизмов инвазии, хотя необходимо отметить, что такие исследования сопряжены со значительными техническими трудностями в виду малых (микроскопических) размеров ранних неоплазий. Поэтому Roysse и соавт. воспользовались лазерной микродиссекцией, чтобы выделить соседние участки неоплазий лёгкой и тяжёлой степени эпителия шейки матки и сравнить их РНК-профили друг с другом и с нормальной тканью методом RNA-Seq [36]. Дифференциально экспрессированные между этими состояниями гены имели отношение к сигнальным путям, контролирующим эпителиальную/эпидермальную дифференцировку, пептид-гидролазную внеклеточную активность и

трансмембранный ионный транспорт. Исследователи полагают, что с помощью такого подхода возможно реконструировать динамику изменений генной активности при развитии ранних форм РШМ.

Сравнительный анализ транскриптома опухолевых клеток, полученных от больных с различным статусом лимфоузлов (LN), может способствовать расширению знаний о механизмах метастазирования. Примером может служить исследование Tian и соавт., в котором с помощью RNA-Seq было проведено сравнение 132 LN(-) и 60 LN(+) образцов РШМ (N0 и N1, соответственно, согласно TNM-номенклатуре) с целью выявить дифференциально экспрессированные транскрипты и сигнальные пути [37]. Было обнаружено, что компоненты PPAR-зависимого сигнального механизма важны для метастазирования РШМ в лимфоузлы. Кроме того, описаны 11 генов, экспрессия которых различалась между N0 и N1 состояниями; из них матриксная металлопротеиназа MMP1 (компонент PPAR-зависимого пути) оказалась единственным геном, экспрессия которого была существенно повышена не только в N1 относительно N0, но также во всех образцах РШМ, в сравнении с нормальной тканью. Поскольку PPAR-механизм регулирует активность липидного/углеводного метаболизма, авторы полагают, что он может быть связан с процессами метастазирования через медиаторы воспаления и эпителиально-мезенхимального перехода (например, лептин, IL-6, IL-8, ANGPTL).

4. Химио- и радиорезистентность. Значительный объем RNA-Seq-данных, накопленных по различным типам рака и дополненных необходимой клинической информацией, в том числе назначенным курсом терапии и результатом лечения, даёт возможность исследовать *in vivo* молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования резистентности опухолевых клеток к лекарственным препаратам и радиоактивному облучению. Например, в работе [38] были использованы RNA-Seq-данные, предоставляемые базой TCGA по 20 типам рака (включая РШМ), для поиска сетей конкурирующих эндогенных ceRNA, обуславливающих резистентность/чувствительность к различным химиотерапевтическим препаратам, например, к цисплатину, наиболее часто применяемому для лечения РШМ и других типов рака. Такие комплексы взаимно конкурирующих мРНК-микроРНК-lncRNA (ceRNA), определяющие эффект цисплатина, были установлены для РШМ; все они оказались вовлечены в регуляцию клеточного цикла, апоптоза, ответа на повреждения ДНК, транспорта и метаболизма ксенобиотиков, фокальной адгезии.

Исследование Xie и соавт. [39] объединило несколько подходов с целью установить возможные причины развития радиорезистентности, которые обуславливают неэффективность радиотерапии РШМ. RNA-Seq профили были совмещены с профилями метилирования ДНК в группах больных, проходивших или не проходивших курс радиотерапии, что позволило установить, на экспрессию каких генов радиотерапия влияет посредством их гипогиперметилирования (среди них CCDC136, ABCG2, CYP26A1, TNN13, CXCL5, SYT13, FOXC2, ITGB3, TMEM233). Выяснилось, что облучение может способствовать гипометилированию и, соответственно, повышению экспрессии некоторых протоонкогенов

и, наоборот, переходу в гиперметилированное состояние и подавлению активности ряда опухолевых супрессоров; в функциональном отношении эти гены вовлечены в регуляцию взаимодействий с межклеточным матриксом, метаболизма ретинола, фокальную адгезию, Hedgehog- и NOD-зависимого сигнальных путей [39].

5. Фенотипическая гетерогенность и классификация РШМ. В течение длительного времени для РШМ отсутствовала классификация по молекулярному фенотипу, в отличие, например, от подробно разработанных классификаций рака яичников или молочной железы. Лишь в 2017 г. TCGA консорциумом был опубликован интегрированный «портрет» РШМ, сочетающий подробную характеристику профилей мутаций, амплификаций, других хромосомных перестроек и транскриптома (мРНК и некодирующих РНК), полученных с помощью RNA-Seq и других вариантов секвенирования [40]. Интеграция разных видов анализа позволила выявить 3 подтипа РШМ, в основе которых лежали транскриптомные кластеры:

- 1) плоскоклеточный (сквамозный) кластер с высокой экспрессией генов кератинового семейства («keratin-high»),
- 2) плоскоклеточный кластер с низкой экспрессией генов кератинового семейства («keratin-low»),
- 3) железистый кластер, имеющий много общих черт с раком эндометрия.

Помимо профиля генной экспрессии данные подтипы различались по профилю соматических мутаций (в том числе в таких генах, как KRAS, ERBB3, HLA-A, CASP8, TGFBR2), профилю амплификаций генов (с более высокой частотой амплификаций в плоскоклеточном кластере), а также имели различные паттерны метилирования CpG островков, что в целом указывает на разные пути развития выделенных подтипов РШМ. Описаны различия в эпигенетической регуляции с участием микроРНК для подтипов РШМ; многие из них направлены на регуляцию эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в результате чего все 3 подтипа имели разный ЭМП-индекс (с наибольшим его значением в «keratin-low» кластере). Существенные различия между подтипами также выявлены для профиля активации других сигнальных путей: для плоскоклеточного кластера была характерна активация p53-, p63-, p73-, AP1-, MYC-, HIF1A-, FGFR3- и MAPK-зависимых путей, что подчеркивает его общность с другими плоскоклеточными карциномами (например, ВПЧ(+) опухолей головы и шеи), а для железистого кластера оказалась характерной активация ER α -, FOXA1-, FOXA2-, FGFR1-зависимых механизмов, что показывает его гормональную (эстрогеновую) зависимость, аналогичную раку эндометрия.

Кроме общей фенотипической классификации разрабатывается также иммунная классификация. Так, на основе интегрированного иммуногеномного анализа 30 не-гематологических типов рака (более 10 000 образцов), включающего их профили RNA-Seq базы TCGA, были установлены 6 пан-раковых иммунных «портретов» или фенотипов (C1–C6): «заживление ран» / ангиогенный (C1), IFN- γ доминирующий (C2), воспалительный (C3), «обеднённый» лимфоцитами (C4), иммунологически «спящий» (C5), TGF- β доминантный (C6) [2]. Данные феноти-

бы были выделены на основе тесно взаимосвязанных показателей: общего количества иммунного инфильтрата, соотношения макрофагальных и лимфоцитарных профилей генной экспрессии, Th1/Th2 соотношения, степени внутриопухолевой гетерогенности, анеуплоидии, мутационной/неоантигенной нагрузки, индекса пролиферации, экспрессии генов иммуномодуляторов, показателей продолжительности жизни. Наиболее интересным представляется факт определяющей роли профиля геномных нарушений (таких как амплификации, делеции, потеря гетерозиготности, ошибки гомологической рекомбинации, точечные мутации в протоонкогенах) в принадлежности к тому или иному иммунному фенотипу. Согласно описываемым данным, РШМ представлен С1 и С2 фенотипами и незначительной долей С4. Схожее распределение фенотипов имеют опухоли головы и шеи; также близкое распределение имеют серозный рак яичников и рак лёгкого (при карциноме яичников чаще встречается С4, а при раке лёгкого преобладает С1 фенотип). С1 фенотип характеризуется повышенной экспрессией про-ангиогенных генов, высокой пролиферативной активностью, преобладанием Th2-профиля. С2 фенотип имеет наиболее выраженную М1/М2-поляризацию макрофагов, высокую долю CD8 клеток, наибольшее разнообразие ТКР, что указывает на развитие иммунного ответа по I типу, однако, он нивелируется высокой скоростью пролиферации опухолевых клеток и самой высокой из всех проанализированных типов рака внутриопухолевой гетерогенностью. С4 фенотип характеризуется М2-профилем и подавленным Th1-ответом. С1 и С2 фенотипы, которыми представлен в основном РШМ, были ассоциированы с наименее благоприятным прогнозом, несмотря на высокое содержание иммунного инфильтрата. Интересно, что для С1 и С2 иммунных фенотипов характерно наличие мутаций в таких ключевых протоонкогенах, как TP53, PIK3CA, PTEN, KRAS, HLA-A, -B, CASP8. Кроме того, С1 и С2 демонстрируют наибольшую частоту амплификаций/делеций в генах иммуномодуляторов (цитокинов, иммунных контрольных точек и т.п.). Из регуляторов Т-НК-межклеточных взаимодействий при иммунном ответе для С1 и С2 фенотипов показана ключевая роль растворимых факторов TGF β , CXCL10, CCL5, IFN γ , Т-клеточных маркеров PD1 и B7-H3 и транскрипционных факторов STAT и IRF семейств [2].

Lu и соавт. с использованием RNA-Seq рассмотрели иммунную гетерогенность в пределах ВПЧ16(+) плоскоклеточного РШМ и выделили 2 его подтипа – HPV16-IMM и HPV16-KRT, объединив тем самым описанные выше классификации [41]. HPV16-KRT характеризовался повышенной экспрессией генов, контролирующих терминальную дифференцировку кератиноцитов, биологическое окисление и WNT-сигнальный путь, в то время как HPV16-IMM имел мезенхимальный профиль и демонстрировал высокую активность иммунного ответа и более высокую чувствительность к химио-/иммунотерапии.

Организменный уровень

Если на молекулярно-клеточном уровне механизмы, поддерживающие развитие опухоли, в значительной степени перекрываются с механизмами, обеспечивающими нормальные онтогенетические

процессы, то на уровне организма онкогенез, бесспорно, представляет патологический процесс, поскольку нарушает системы функционирования организма и может приводить к его гибели. Соответственно, достаточно большое число исследований нацелено на установление корреляций между характеристиками транскриптома опухоли и такими параметрами, как общий и безрецидивный периоды продолжительности жизни, риск рецидивирования, ответ на терапию (цитотоксическую/таргетную, иммунотерапию). Эти исследования имеют выраженную клиническую направленность, т.к. акцентированы на поиске и изучении биомаркеров заболевания. Например, с прогнозом продолжительности жизни больных РШМ были ассоциированы специфические паттерны экспрессии микроРНК [42], длинных некодирующих РНК [43], а также интегрированные РНК-сигнатуры, представляющие сети конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA) [44–46]. Также исследуется корреляция уровня мРНК-экспрессии отдельных семейств генов с вышеуказанными клиническими параметрами. Например, такая взаимосвязь установлена для 39 представителей семейства НОХ-генов (Номеобох транскрипционных факторов) [47] и 18 представителей семейства гистонов [48]. Кроме паттернов экспрессии отдельных видов РНК, ведётся поиск целых сигнальных путей, ассоциированных с прогнозом для пациенток с РШМ [49]. На систематизацию и валидацию потенциальных прогностических биомаркеров РШМ направлено создание специализированных онлайн Web-серверов[50].

В рамках проблемы диагностики и лечения РШМ можно выделить исследования, в которых RNA-Seq помогает в идентификации системных показателей, имеющих перспективу использования в качестве диагностических маркеров. Такими системными показателями могут быть, например, профили транскриптома циркулирующих лейкоцитов. Nie и соавт. было проведено HiSeq-профилирование изменений транскриптома клеток периферической крови, полученных от больных с РШМ, карциномой носоглотки и языка, непосредственно до и после (в течение 16 ч) первого курса радиотерапии с целью оценить возможность использования полученных транскриптомных профилей в качестве предикторов ответа на радиотерапию и показателей степени её токсичности [51]. Более 600 генов имели достоверные различия в экспрессии до и после облучения больной с РШМ IIIA стадии, из них экспрессия гена TAC2, кодирующего гемокинин (регулятор миелоцитарной пролиферации), оказалась наиболее повышенной, а гена ID1 (фактора самообновления клеток и устойчивости в повреждениям ДНК) – наиболее подавленной. Гены, дифференциально экспрессированные до и после облучения, оказались задействованы (согласно Gene Ontology и KEGG) в таких сигнальных путях и биологических процессах, как регуляция транскрипции, ДНК-связывающей активности, киназной активности, вирусной инфекции, взаимодействий цитокинов с их рецепторами. Авторы предполагают, что такой спектр активности сигнальных путей отражает сходство ответа на вирусную инфекцию и на облучение, который проявляется в системном запуске воспалительных реакций. Гены, экспрессия которых в клетках крови изменяется под воздействием облучения у всех 3 групп пациентов (с карциномой

шейки матки, носоглотки и языка), задействованы в механизмах, зависимых от TNF α , NOD-подобных рецепторов и NF κ B; установлена их ассоциация с гематологической токсичностью радиотерапии [51].

Заключение

Изложенные выше факты убедительно говорят о том, что технология RNA-Seq стала важным аналитическим инструментом, который позволил найти подтверждения многим гипотезам по принципиальным вопросам механизмов канцерогенеза. Основные усилия исследователей, использующих приложения RNA-Seq, направлены на установление взаимосвязей между разными уровнями регуляции (молекулярным, клеточным и уровнем организма) в норме и при развитии онкопатологии. Несмотря на разные ограничения и сложности, сопряжённые с получением, анализом и интерпретацией RNA-Seq данных, имеющиеся сегодня сведения по геномным и транскриптомным профилям позволили не только исследовать многообразие вариантов развития опухолей эпителиального происхождения и выявить особенности каждой из них, но также понять их общность как биологического явления. Без этого понимания невозможно дальнейшее совершенствование методов диагностики и лечения.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №17-15-01024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Cubuk C., Hidalgo MR., Amadoz A., Pujana M.A., Mateo F., Herranz C. et al. Gene Expression Integration into Pathway Modules Reveals a Pan-Cancer Metabolic Landscape. *Cancer Res.* 2018; 78 (21): 6059–72.
- Thorsson V., Gibbs D.L., Brown S.D., Wolf D., Bortone D.S., Ou Yang T.H. et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018; 48 (4): 812–30.
- Campbell J.D., Yau C., Bowlby R., Liu Y., Brennan K., Fan H. et al. Genomic, Pathway Network, and Immunologic Features Distinguishing Squamous Carcinomas. *Cell Rep.* 2018; 23(1): 194–12.
- Berger A.C., Korkut A., Kanchi R.S., Hegde A.M., Lenoir W., Liu W. et al. A Comprehensive Pan-Cancer Molecular Study of Gynecologic and Breast Cancers. *Cancer Cell.* 2018; 33(4): 690–705.
- Cantalupo P.G., Katz J.P., Pipas J.M. Viral sequences in human cancer. *Virology.* 2018; 513: 208–16.
- Lau D., Bobe A.M., Khan A.A. RNA Sequencing of the Tumor Microenvironment in Precision Cancer Immunotherapy. *Trends Cancer.* 2019; 5 (3): 149–56.
- Finotello F., Trajanoski Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. *Cancer Immunol. Immunother.* 2018; 67 (7): 1031–40.
- Hao Y., Yan M., Heath B.R., Lei Y.L., Xie Y. Fast and robust deconvolution of tumor infiltrating lymphocyte from expression profiles using least trimmed squares. *PLoS Comput. Biol.* 2019; 15 (5): e1006976.
- Nirmal A.J., Regan T., Shih B.B., Hume D.A., Sims A.H., Freeman T.C. Immune Cell Gene Signatures for Profiling the Microenvironment of Solid Tumors. *Cancer Immunol. Res.* 2018; 6 (11): 1388–400.
- Lawson J.S., Salmons B., Glenn W.K. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). *Front. Oncol.* 2018; 8: 1.
- Wu Y., Zhao J., Dong S., Wang Y., Li A., Jiang Y. et al. Whole-exome and RNA sequencing reveal novel insights into the pathogenesis of HPV associated cervical cancer. *Cancer Biomark.* 2019; 25 (4): 341–50.
- Cui T., Enroth S., Ameer A., Gustavsson I., Lindquist D., Gyllensten U. Invasive cervical tumors with high and low HPV titer represent molecular subgroups with different disease etiology. *Carcinogenesis.* 2019; 40 (2): 269–78.
- Bhuvaneshwar K., Song L., Madhavan S., Gusev Y. viGEN: An Open Source Pipeline for the Detection and Quantification of Viral RNA in Human Tumors. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1172.
- Chen Y.P., Wang Y.Q., Lv J.W., Li Y.Q., Chua M.L.K., Le Q.T. et al. Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *Ann. Oncol.* 2019; 30 (1): 68–75.
- Banister C.E., Liu C., Pirisi L., Creek K.E., Buckhaults P.J. Identification and characterization of HPV-independent cervical cancers. *Oncotarget.* 2017; 8(8): 13375–86.
- Tamura R., Yoshihara K., Saito T., Ishimura R., Martínez-Ledesma J.E., Xin H. et al. Novel therapeutic strategy for cervical cancer harboring FGFR3-TACC3 fusions. *Oncogenesis.* 2018; 7 (1): 4.
- Qin Y., Ekmekcioglu S., Forget M.A., Szekvolgyi L., Hwu P., Grimm E.A. et al. Cervical Cancer Neoantigen Landscape and Immune Activity is Associated with Human Papillomavirus Master Regulators. *Front. Immunol.* 2017; 8: 689.
- Wu P., Yang S., Singh S., Qin F., Kumar S., Wang L. et al. The Landscape and Implications of Chimeric RNAs in Cervical Cancer. *EBioMedicine.* 2018; 37: 158–67.
- Kahles A., Lehmann K.V., Toussaint N.C., Hüser M., Stark S.G., Sachsenberg T. et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. *Cancer Cell.* 2018; 34 (2): 211–24.
- Gong J., Jiang H., Shu C., Hu M.Q., Huang Y., Liu Q. et al. Integrated analysis of circular RNA-associated ceRNA network in cervical cancer: Observational Study. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98 (34): e16922.
- Luo W., Wang M., Liu J., Cui X., Wang H. Identification of a six lncRNAs signature as novel diagnostic biomarkers for cervical cancer. *J. Cell Physiol.* 2019. doi: 10.1002/jcp.29015.
- Wu W.J., Shen Y., Sui J., Li C.Y., Yang S., Xu S.Y. et al. Integrated analysis of long non-coding RNA competing interactions revealed potential biomarkers in cervical cancer: Based on a public database. *Mol. Med. Rep.* 2018; 17 (6): 7845–58.
- Chen B.J., Byrne F.L., Takenaka K., Modesitt S.C., Olzomer E.M., Mills J.D. et al. Transcriptome landscape of long intergenic non-coding RNAs in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2017; 147(3): 654–62.
- Chen H., Li C., Peng X., Zhou Z., Weinstein J.N.; Cancer Genome Atlas Research Network, Liang H. A Pan-Cancer Analysis of Enhancer Expression in Nearly 9000 Patient Samples. *Cell.* 2018; 173 (2): 386–99.
- Snoek B.C., Verlaat W., Babion I., Novianti P.W., van de Wiel M.A., Wilting S.M1. et al. Genome-wide microRNA analysis of HPV-positive self-samples yields novel triage markers for early detection of cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 2019; 144 (2): 372–79.
- Shi C., Yang Y., Zhang L., Zhang T., Yu J., Qin S., Gao Y. Optimal subset of signature miRNAs consisting of 7 miRNAs that can serve as a novel diagnostic and prognostic predictor for the progression of cervical cancer. *Oncol. Rep.* 2019; 41 (6): 3167–78.
- Weng S.L., Huang K.Y., Weng J.T., Hung F.Y., Chang T.H., Lee T.Y. Genome-wide discovery of viral microRNAs based on phylogenetic analysis and structural evolution of various human papillomavirus subtypes. *Brief Bioinform.* 2018; 19(6): 1102–14.
- Cui J.H., Lin K.R., Yuan S.H., Jin Y.B., Chen X.P., Su X.K. et al. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2729.
- Hu X., Zhang J., Wang J., Fu J., Li T., Zheng X., et al. Landscape

- of B cell immunity and related immune evasion in human cancers. *Nat. Genet.* 2019; 51 (3): 560–67.
30. Valdes-Mora F., Handler K., Law A.M.K., Salomon R., Oakes S.R., Ormandy C.J., Gallego-Ortega D. Single-Cell Transcriptomics in Cancer Immunobiology: The Future of Precision Oncology. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2582.
31. Punt S., Corver W.E., van der Zeeuw S.A., Kielbasa S.M., Osse E.M., Buermans H.P. et al. Whole-transcriptome analysis of flow-sorted cervical cancer samples reveals that B cell expressed TCL1A is correlated with improved survival. *Oncotarget.* 2015; 6 (36): 38681–94.
32. Cao S., Wylie K.M., Wyczalkowski M.A., Karpova A., Ley J., Sun S. et al. Dynamic host immune response in virus-associated cancers. *Commun. Biol.* 2019; 2: 109.
33. Wang J., Li Z., Gao A., Wen Q., Sun Y. The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cells in cervical cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 120: 109444.
34. Roufas C., Chasiotis D., Makris A., Efstathiades C., Dimopoulos C., Zaravinos A. The Expression and Prognostic Impact of Immune Cytolytic Activity-Related Markers in Human Malignancies: A Comprehensive Meta-analysis. *Front. Oncol.* 2018; 8: 27.
35. Rooney M.S., Shukla S.A., Wu C.J., Getz G., Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell.* 2015; 160 (1-2): 48–61.
36. Roysse K.E., Zhi D., Conner M.G., Clodfelder-Miller B., Srinivasasainagendra V., Vaughan L.K. et al. Differential Gene Expression Landscape of Co-Existing Cervical Pre-Cancer Lesions Using RNA-seq. *Front. Oncol.* 2014; 4: 339.
37. Tian R., Li X., Gao Y., Li Y., Yang P., Wang K. Identification and validation of the role of matrix metalloproteinase-1 in cervical cancer. *Int. J. Oncol.* 2018; 52 (4): 1198–208.
38. Zhang Y., Li X., Zhou D., Zhi H., Wang P., Gao Y. et al. Inferences of individual drug responses across diverse cancer types using a novel competing endogenous RNA network. *Mol. Oncol.* 2018; 12 (9): 1429–46.
39. Xie F., Dong D., Du N., Guo L., Ni W., Yuan H. et al. An 8-gene signature predicts the prognosis of cervical cancer following radiotherapy. *Mol. Med. Rep.* 2019; 20 (4): 2990–3002.
40. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature.* 2017; 543 (7645): 378–84.
41. Lu X., Jiang L., Zhang L., Zhu Y., Hu W., Wang J. et al. Immune Signature-Based Subtypes of Cervical Squamous Cell Carcinoma Tightly Associated with Human Papillomavirus Type 16 Expression, Molecular Features, and Clinical Outcome. *Neoplasia.* 2019; 21 (6): 591–601.
42. Liu H., Liu L., Zhu H. The Role of Significantly Deregulated MicroRNAs in Recurrent Cervical Cancer Based on Bioinformatic Analysis of the Cancer Genome Atlas Data. *J. Comput. Biol.* 2019; 26 (4): 387–95.
43. Mao Y., Fu Z., Dong L., Zheng Y., Dong J., Li X. Identification of a 26-lncRNAs Risk Model for Predicting Overall Survival of Cervical Squamous Cell Carcinoma Based on Integrated Bioinformatics Analysis. *DNA Cell Biol.* 2019; 38 (4): 322–32.
44. Xiong J., Guo S., Bing Z., Su Y., Guo L. A Comprehensive RNA Expression Signature for Cervical Squamous Cell Carcinoma Prognosis. *Front. Genet.* 2019; 9: 696.
45. Xia L., Wang H., Cai S., Su X., Shen J., Meng Q. et al. Integrated Analysis of a Competing Endogenous RNA Network Revealing a Prognostic Signature for Cervical Cancer. *Front. Oncol.* 2018; 8: 368.
46. Qin S., Gao Y., Yang Y., Zhang L., Zhang T., Yu J., Shi C. Identifying Molecular Markers of Cervical Cancer Based on Competing Endogenous RNA Network Analysis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2019; 84(4): 350–9.
47. Eoh K.J., Kim H.J., Lee J.Y., Nam E.J., Kim S., Kim S.W., Kim Y.T. Upregulation of homeobox gene is correlated with poor survival outcomes in cervical cancer. *Oncotarget.* 2017; 8 (48): 84396–402.
48. Li X., Tian R., Gao H., Yang Y., Williams B.R.G., Gantier M.P. et al. Identification of a histone family gene signature for predicting the prognosis of cervical cancer patients. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 16495.
49. Li X., Tian R., Gao H., Yan F., Ying L., Yang Y. et al. Identification of Significant Gene Signatures and Prognostic Biomarkers for Patients With Cervical Cancer by Integrated Bioinformatic Methods. *Technol. Cancer Res Treat.* 2018; 17: 1533033818767455.
50. Wang Q., Zhang L., Yan Z., Xie L., An Y., Li H. et al. OSec: an online survival analysis web server to evaluate the prognostic value of biomarkers in cervical cancer. *Future Oncol.* 2019; doi: 10.2217/fon-2019-0412.
51. Nie Y.H., Liu X.D., Huang R., Xie D.F., Yin W.J., Guan H. et al. Analysis of mRNA Expression Patterns in Peripheral Blood Cells of 3 Patients With Cancer After the First Fraction of 2 Gy Irradiation: An Integrated Case Report and Systematic Review. *Dose Response.* 2019; 17 (1): 1559325819833474.

Поступила 25.10.2019
Принята к печати 06.11.2019