

РАК ПИЩЕВОДА: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чекини А.К., Серебрянская М.В., Любченко Л.Н., Давыдов М.М.

ФГБУ "РОИЦ им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва, e-mail: docpro13@gmail.com

Рак пищевода – один из самых агрессивных среди злокачественных новообразований и занимает лидирующее шестое место в структуре смертности в Мире. Одногo хирургического лечения, как правило, не достаточно для достижения продолжительного периода без прогрессирования. Новые методы исследования позволяют с высокой точностью определять широкий спектр мутаций генов, вовлеченных в канцерогенез рака пищевода. Основываясь на данных проведенных исследований по молекулярному профилированию, представляется наиболее перспективным изучение мутаций генов PIK3CA, NOTCH1, ERBB2, KRAS и TP53, а также амплификации гена PTEN. Гистологический тип опухоли и популяционные характеристики вносят вклад в вариабельность частот мутаций. Проведение широкомасштабных исследований по скринингу геномных перестроек является перспективным направлением при разработке диагностики, лечения и профилактики рака пищевода.

Ключевые слова: рак пищевода, генетические перестройки, секвенирование нового поколения.

ESOPHAGEUS CANCER: MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS

Chekini A.K., Serebryanskaya M.V., Lyubchenko L.N., Davydov M.M.

Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, e-mail: docpro13@gmail.com

Esophageus cancer is one of the most aggressive neoplasia among malignant tumors and it is described as one of the leader because of the sixth place in the mortality rate globally. In the majority of cases, surgery is not sufficient variant of treatment to achieve a long progression – free period. New investigation methods have given us the opportunity to determine a wide variety of gene mutations involved in the carcinogenesis of esophageal cancer. The most promising strategic way that is based on the genetic investigations of the molecular profiling is to study the mutational spectrum of PIK3CA, NOTCH1, ERBB2, KRAS, TP53 genes and PTEN amplification. The variety of mutations also depends on histological type of tumour and population characteristics. Large spectrum analysis of genomic alterations is a perspective direction for improvement of diagnostics, treatment and prevention of esophageal cancer.

Keywords: esophageus cancer, genomic alterations, next-generation sequencing.

Рак пищевода является одним из самых агрессивных среди злокачественных новообразований и занимает лидирующее шестое место в структуре смертности в Мире [16]. По данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC) на 2008 г., заболеваемость составила 49,2 случая на 100 тыс. населения в год, смертность – 34,3 на 100 тыс. По расчётам Росстата Минздрава РФ заболеваемость среди мужчин и женщин составила 7.6 и 2.4 случая на 100 тыс. населения, соответственно. Примерно, 70 % патологии приходится на Китай, с преобладанием плоскоклеточного рака пищевода (ППР) в 90 %, с 10 % пятилетней выживаемостью таких пациентов. Достаточно эффективного лечения до сих пор не найдено, результаты химиолучевого лечения остаются неудовлетворительными, и с точки зрения генетики патогенез заболевания остается загадкой.

Рак пищевода по своим генетическим характеристикам имеет неоднородную структуру. Благодаря активному прогрессу в молекулярной онкологии и фармакологии, появилось понятие таргетного лечения, и за последнее десятилетие было создано около двух десятков специфических молекулярных ингибиторов [1]. Международные публикации по

поводу исследования мутационного статуса генов *H-RAS* и *TP53* при раке пищевода начинают появляться с 1994 года [11]. В настоящее время одной из наиболее многообещающих мишеней для молекулярно-направленной терапии является рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*). Частота встречаемости данных мутаций ранее не оценивалась с необходимой достоверностью, в связи с небольшими размерами выборок больных РП (около 80 пациентов) [12]. Известно также, что мутации генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и каталитической субъединицы фосфатидилинозитол-3-киназы (*PIK3CA*), а также дисрегуляция экспрессии гена *PTEN* являются показателями анти-*EGFR* терапии при колоректальном раке и других злокачественных новообразованиях [4].

Группой ученых из Японии во главе с Shigaki H. и его коллегами было проведено исследование мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* у 203 пациентов с ППП с помощью технологии пиросеквенирования. Были оценены следующие соматические мутации: с.35G>T (кодон 12 GGT>GTT), с.35G>A (кодон 12 GGT>GAT), с.34G>T (кодон 12 GGT>TGT), с.38G>A (кодон 13 GGC>GAC), которые ранее обнаруживались в 100 % случаев (9 из 9) клеточных линий РП с помощью технологии Scorpion-ARMS. Однако мутации в гене *KRAS* были выявлены лишь в 1 случае ППП из 203, что составляет 0.5 % от общего числа пациентов, а мутации гена *BRAF* совсем отсутствовали – 0 из 203. Результаты представленной работы дали возможность предположить, что мутации генов *KRAS* и *BRAF* играют очень ограниченную роль в развитии ППП, и этот диагностический тест не является необходимым в качестве скрининга на определение чувствительности к анти-*EGFR* терапии [12].

Bettstetter M. и его коллеги исследовали мутационный статус у 117 первично-операбельных больных аденокарциномой пищевода, проводя корреляцию между экспрессией *EGFR* и амплификацией генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *PTEN*, объединяя результаты. Мутации гена *KRAS* встречались у 4 (3 %) из 117 больных (3× G12D и 1× G12V мутации). В одном образце опухоли была выявлена мутация в гене *PIK3CA* (E545K), а мутации в генах *NRAS* и *BRAF* не встречались. У 16 из 117 пациентов (14 %) не было обнаружено мутаций в гене *PTEN*. При иммуногистохимическом анализе было выявлено снижение экспрессии гена *PTEN*, которое оценивалось преимущественно при распространенных стадиях болезни ($P = 0.004$). Не было показано корреляции между мутационным *EGFR* статусом и экспрессионным статусом гена *PTEN*. Функциональная потеря гена *PTEN* была связана с более короткой общей выживаемостью и выживаемостью без прогрессирования ($P < 0.001$ каждый), а также являлась независимым прогностическим фактором в мультифакторном анализе ($P = 0.015$). Статус гена *EGFR* не был ассоциирован с прогностической значимостью, тогда как снижение экспрессии в гене *PTEN* имело весомое значение при аденокарциноме пищевода (АП) и было связано с агрессивным фенотипом,

обосновывая оценку статуса *PTEN* как биомаркера. В контраст этому, мутационный статус каскада *RAS/RAF/PIK3CA*, по результатам этой работы, имел незначительное клиническое приложение [4].

Интересная работа была проведена Q.-W. Liu, где в отобранной выборке 50 пациентов с ПРП были изучены образцы опухоли после хирургической резекции пищевода. Мутации в 18–21 экзонах гена *EGFR* определялись с помощью технологии мутационно-специфической ПЦР с использованием праймеров Scorpions (SARMS). Мутации в 12,13 кодонах гена *KRAS* были обнаружены путем прямого секвенирования. Корреляция между клинико-патологическими особенностями и мутационным статусом генов *EGFR* и *KRAS* была проанализирована с использованием Пакета программ обработки статистических данных. В этом исследовании, миссенс-мутации G719X и L858R и делеции со сдвигом рамки считывания были выявлены в 14 % случаев (у 7 из 50 пациентов). Мутации в 12-ом кодоне гена *KRAS* диагностированы в 12 % случаев (6/50). В одном образце были обнаружены мутации генов *EGFR* и *KRAS* одновременно. Наличие *EGFR* и *KRAS* мутаций не было связано с полом, возрастом, курением в анамнезе, дифференцировкой клеток, или стадией заболевания. Частота встречаемости *EGFR* и *KRAS* мутаций у пациентов с ПРП была выше, чем было представлено в ранее выполненных исследованиях, что, возможно, связано с популяционными различиями. Показано также, что при ПРП мутации в генах *EGFR* и *KRAS* могут быть ко-сегрегированы [8].

Мутационный статус также оценивался не только при ПРП, но и при базалоидном подтипе. Базалоидная плоскоклеточная карцинома (БПК) пищевода является редким заболеванием, с особыми характеристиками, и является вариантом плоскоклеточного рака пищевода. В этом исследовании учёные изучили генетические и эпигенетические перестройки, такие как соматические мутации в генах *KRAS*, *BRAF* и *PIK3CA*, экспрессию гена *TP53* и метилирование суррогатного маркера LINE-1 (длинного диспергированного ядерного элемента). Из 502 образцов 22 (4.4 %) являлись базалоидным вариантом ПРП, 440 (87 %) другими подтипами плоскоклеточного рака пищевода, что было подтверждено гистологически. Не было никакой прогностической разницы между БПРП и ПРП ($p = 0.41$). *KRAS* или *BRAF* мутации не встречались при базалоидном типе ПРП, в то время как 23 % образцов ПРП содержали мутацию в гене *PIK3CA*, отсутствующую во всех образцах БПРП ($p = 0.002$). Не было различий экспрессионного профиля гена *TP53* при БПРП и ПРП ($p = 0.57$). Тогда как низкий уровень экспрессии LINE-1 был характерен для БПРП ($p < 0.0001$). Определение мутационного и экспрессионного профилей могут менять терапевтическую стратегию при ПРП и БПРП [3].

Что касается АП, в 2016 году было проведено несколько исследований, касающихся диагностики соматических мутаций генов, вовлеченных в канцерогенез рака пищевода. Шведская команда учёных под руководством Hedner С. опубликовала результаты исследования, целью которого было проанализировать прогностическую значимость рецептора эпидермального фактора роста 1 (*HER1/EGFR*) и 3 (*HER3*), а также встречаемость *EGFR* и *KRAS* мутаций при аденокарциноме желудка и пищевода. Иммуногистохимически была определена экспрессия *EGFR* и *HER3* во всех первичных опухолях и пораженных метастатических узлах у 174 пациентов с аденокарциномой желудка, кардии и пищевода. Мутационный статус генов *EGFR* и *KRAS* определялся с помощью технологии пиросеквенирования. По результатам этой работы был сделан вывод, что экспрессия гена *EGFR* является независимым прогностическим фактором и характеризуется более коротким периодом общей выживаемости. Мутации в гене *KRAS* были обнаружены только у 4 % пациентов и не имели прогностической значимости. Все опухоли содержали ген *EGFR* дикого типа. Исследователи обратили внимание, что полученные данные интересны в отношении продолжения попыток по поиску потенциальной клинической значимости различных *HER*-мутаций при раке желудка и АП [5].

Miller С.Т. и его команда выполнили исследование по определению молекулярных характеристик пациентов с аденокарциномой, возникающей на фоне пищевода Барретта. Исследование проводилось с помощью методов полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и Саузерн-блоттинга. Одна или более амплификаций встречались у 50 пациентов из 87, что составило 57 %. Амплификация гена *ERBB2* встретилась в 19 из 87 (21.8 %), *CCNE1* у 11 из 87 (12.6 %), *GATA4* у 9 из 87 (10.3 %), *KRAS* у 9 из 87 (10.3 %), *EGFR* у 7 из 87 (8.0 %), *CCND1* у 6 из 87 (6.8 %), *HNF3-alpha* у 5 из 87 (5.7 %), *PIK3CA* у 5 из 87 (5.7 %), *C-MYC* у 4 из 87 (4.6 %), *DYRK2* у 2 из 87 (2.3 %), и *AIB1*, *AKT1* и *IGF1R* у 0 из 87 (0 %) отобранных образцов. Амплификация *CCND1* была связана с меньшей выживаемостью ($P < 0.05$). В дополнение, положительная амплификация *ERBB2* коррелировала с наличием амплификации ($P < 0.05$) *GATA4*. Повышенное количество копий *ERBB2* (1 из 22), *GATA4* (1 из 22), *KRAS* (2 из 22), *C-MYC* (1 of 22), *CCNE1* (2 из 22), и *CCND1* (2 из 22) генов было также изучено, но встретилось лишь у одного пациента с пищеводом Барретта с выраженной дисплазией [9].

В последние годы увеличилось количество работ, посвященных клинико-генетическим корреляциям при злокачественных новообразованиях [5]. Согласно публикациям, мутации в гене *PIK3CA* обнаруживаются при многих опухолях, но коррелирует с различным прогнозом в зависимости от локализации. Частота встречаемости мутации гена при ПРП ранее изучалась, но должного прогностического анализа не было. Присутствие мутации гена *PIK3CA* связывают с плохим прогнозом у пациентов с

колоректальным раком и раком лёгкого, тогда как *mtPIK3CA*-статус определяет благоприятный прогноз у пациентов, страдающих раком молочной железы [13].

В хирургическом отделении университета Нагойя, с 1996 года по 2003 г. было исследовано 88 образцов РП, где с помощью *real-time*-ПЦР осуществлялся поиск мутаций в 9 и 20 экзонах гена *PIK3CA*. В 2.2 % случаев выявлены мутации в 9 экзоне - E545K (G1633A) и E545Q (G1633C). Тогда как у пациентов с установленным диагнозом рак пищевода, мутаций в 20 экзоне обнаружено не было [10].

Shigaki H. и его команда изучили 219 образцов ПРП и 8 клеточных линий с помощью методики пиросеквенирования. Мутация *PIK3CA* в 9 и/или 20 экзоне определялась в 46 случаях образцах ПРП, что составило 21 %. В клеточных линиях мутаций найдено не было. Наличие мутации *PIK3CA* было в значительной степени ассоциировано с полом, возрастом, курением, употреблением алкоголя и гистологической дифференцировкой. В сравнении со случаями дикого типа *PIK3CA*, пациенты с мутацией в 9 и/или 20 экзонах показали значительно лучшую выживаемость без прогрессирования [лог-ранговый критерий $P = 0.0089$] и общую выживаемость (Критерий Кокса $P = 0.012$) [14].

В 2014 г. китайские генетики включили в исследование девяносто шесть послеоперационных образцов ПРП. Таргетная панель включала гены *PIK3CA* (экзоны 9 и 20), *EGFR* (экзоны 18, 19, 20 и 21), *KRAS* (экзоны 2 и 3) и *BRAF* (экзоны 11 и 15). Мутация *PIK3CA* была выявлена у 12 из 96 пациентов с ПРП (12.5 %). Мутаций в генах *EGFR*, *KRAS* или *BRAF* обнаружено не было. В итоге, была продемонстрирована корреляция между клинично-патогенетическими характеристиками и оценкой выживаемости при мутантном *PIK3CA* статусе. Интересен тот факт, что мутация чаще встречалась у женщин с ПРП (31.3 %, 5/16), чем у мужчин (8.8 %, 7/80), и у пациентов без метастазов в лимфатические лимфоузлы (4.4 %, 2/45, $P = .025$). Исследователи предположили, что определение статуса *PIK3CA* может быть перспективным в качестве предиктивного маркера [6].

В январе 2016 года в журнале *Oncotarget* была опубликована статья Song B. с соавт., с целью оценки статуса гена *NOTCH1* в препаратах рака пищевода. Была обнаружена статистически значимая корреляция между мутациями *NOTCH1* и *PIK3CA* в образцах ПРП. *MtNOTCH1*-статус был ассоциирован с ранними стадиями заболевания, высокой дифференцировкой опухолей, низкой частотой метастатического поражения регионарных лимфоузлов. Тем не менее пациенты с мутацией *NOTCH1* хуже отвечали на лекарственное лечение и имели более низкие показатели общей выживаемости. В контраст этому пациенты с мутацией *PIK3CA* показывали лучший ответ на химиотерапию и более продолжительную выживаемость, по сравнению с пациентами без мутации *PIK3CA*. Эти данные представляют важную прогностическую значимость, однако имеют популяционную зависимость [14].

В исследовании, опубликованном в журнале *Cancer Genomics Proteomics* в мае 2016 года, осуществлялся поиск мутаций в генах *TP53*, *PIK3CA*, *FBXW7* и *KRAS* с помощью панелей Ion PGM и AmpliSeq Cancer методом таргетного секвенирования. В результате исследования в 64 образцах было обнаружено 45 генов, связанных со злокачественными новообразованиями пищевода. Мутации гена *TP53* определялись в 20.3 % (13/64) образцов, горячие точки локализовались в 5 экзоне (р. A159V, р. R175H, р. C176F, р. C275Y и р. H179R), 7 экзоне (р. S241F), 8 экзоне (р. C275Y, р. P278S и р. E298*) и 10 экзонах (р. R342*). Больше количество мутаций в гене *TP53* было найдено в образцах ПРП, нежели в АП (22.9 % против 14.3 %, соответственно), однако, данная разница не была значимой (p=0.523). Частота мутаций в гене *PIK3CA* не зависела от пола, 18.5 % – среди мужчин и 21.6 % – среди женщин. Мутации гена *PIK3CA* были найдены в 3 из 64 образцов, что составило 4.7 %. Это были миссенс-мутации, расположенные в горячих точках 9 экзона: р. E542K и р. E545K. Два образца (3.1 %) содержали мутацию в гене *FBXW7*: одну в 8 экзоне (р. R465C) и одну в 9 экзоне (р. R505L). Интересно также то, что образец АП с мутацией *FBXW7* р. A465C содержал две мутации в гене *KRAS*, одну во 2 экзоне (р. G13D) и одну в 3 экзоне (р. A59T). Глобально, был сделан вывод, что таргетное секвенирование является методом, способным достоверно определять мутационный статус отдельных опухолей, что позволяет использовать эту технологию в рутинной клинической практике.

Группой исследователей из различных клиник США был представлен отчёт о работе по определению различий и сходств распространенного плоскоклеточного рака и АП с помощью высокоразрешающего геномного профилирования [7, 2]. Так, в одном из исследований секвенирование нового поколения осуществлялось для всех кодирующих экзонов 315 генов, вовлечённых в канцерогенез. Результаты включали точечные мутации, короткие инсерции и делеции, амплификации генов, гомозиготные делеции. Клинически значимые геномные перестройки, имеющие связь с одобренными препаратами и находящимися на стадии оценки в тех клинических испытаниях, где определяющим фактором является механизм генетических изменений, были оценены в результате секвенирования. Средний возраст всех пациентов составил 63 года, гендерных различий отмечено не было. В 71 образце ПРП и 231 АП содержались различные геномные перестройки – 522 в ПРП (7.4 на образец) и 1,303 – в АП (5,6 на образец). Частота клинически значимых полиморфизмов при ПРП составила 94 % (2.6 на образец) и 93 % при АП (2.7 на образец). При АП наиболее часто встречались мутации в гене *KRAS* – 23 % АП против 6 % ПРП и мутации *ERBB2* – 23 % АП против 3 % ПРП. ПРП в 24 % случаев был ассоциирован с мутациями в генах *CRGA* и *PIK3CA* по сравнению с АП (10%), мутации в гене *PTEN* составили 11 % при ПРП против 4 % при АП, мутации в гене *NOTCH1* также

чаще встречались при ПРП – 17 %. Другие перестройки, количество которых значительно варьировало в зависимости от типа опухоли, включали мутации в генах *SMAD4* (14 % АП против 1 % ПРП), *RBI* (14 % ПРП против 2 % АП), *SOX2* (18 % ПРП против 1 % АП), и *NFE2L2* (24 % ПРП против 1 % АП) [7].

Таким образом, клинически значимые мутационные профили значительно варьируют при АП и ПРП. Высокоразрешающее геномное профилирование повышает эффективность идентификации клинически значимых мутаций и при ПРП, и при АП, предполагая новые возможности для молекулярно-направленного лечения рака пищевода.

Список литературы

1. Имянитов Е.Н. Общие представления о таргетной терапии. – СПб.: Центр ТОММ, 2010. Практическая онкология. – Т. 11, № 3.
2. Ansorge W.J., Next-generation DNA sequencing techniques. N Biotechnol. 2009 Apr.; 25(4):195-203.
3. Baba Y., Ishimoto T., Harada K., Kosumi K., Murata A., Miyake K., Hiyoshi Y., Kurashige J., Iwatsuki M., Iwagami S., Miyamoto Y., Sakamoto Y., Yoshida N., Oki E., Iyama K., Watanabe M., Baba H. Molecular Characteristics of Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: Analysis of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations and LINE-1 Methylation. Ann Surg Oncol. 2015. Oct.; 22(11):3659-65.
4. Bettstetter M., Berezowska S., Keller G., Walch A., Feuchtinger A., Slotta-Huspenina J., Feith M., Drecoll E., Höfler H., Langer R. Epidermal growth factor receptor, phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit/PTEN, and KRAS/NRAS/BRAF in primary resected esophageal adenocarcinomas: loss of PTEN is associated with worse clinical outcome. Hum Pathol. 2013. May; 44(5):829-36.
5. Hedner C.1, Borg D.1, Nodin B.1, Karnevi E.1, Jirström K.1, Eberhard J.1. Expression and Prognostic Significance of Human Epidermal Growth Factor Receptors 1 and 3 in Gastric and Esophageal Adenocarcinoma. PLoS One. 2016. Feb. 4; 11(2):e0148101.
6. Hou J.1, Jiang D.1, Zhang J.2, Gavine P.R.2, Xu S.3, Liu Y.1, Xu C.1, Huang J.1, Tan Y.1, Wang H.3, Lu Y.2, Zheng L.2, Hou Y.4, Tan L.5. Frequency, characterization, and prognostic analysis of PIK3CA gene mutations in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. Hum Pathol. 2014. Feb.; 45(2):352-8.
7. Kai Wang, Adrienne Johnson, Sirai M. Ali, Samuel J. Klempner, Tanios Bekaii-Saab, Jeffrey L. Vacirca, Depinder Khaira, Roman Yelensky, Juliann Chmielecki, Julia A. Elvin, Doron Lipson, Vincent A. Miller, Philip J. Stephens, Jeffrey S. Ross. Comprehensive Genomic Profiling

of Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinomas and Esophageal Adenocarcinomas Reveals Similarities and Differences. *The Oncologist*. 2015; 20: 1132–1139.

8. Liu Q.W., Fu J.H., Luo K.J., Yang H.X., Wang J.Y., Hu Y., Yang H., Bella E. Identification of EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2011 Jul.; 24(5):374-80.

9. Miller C.T., Moy J.R., Lin L., Schipper M., Normolle D., Brenner D.E., Iannettoni M.D., Orringer M.B., Beer D.G. Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin. Cancer Res*. 2003. Oct. 15; 9(13): 4819-25.

10. Mori R., Ishiguro H., Kimura M., Mitsui A., Sasaki H., Tomoda K., Mori Y., Ogawa R., Katada T., Kawano O., Harada K., Fujii Y., Kuwabara Y. PIK3CA mutation status in Japanese esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Res*. 2008. Apr.; 145(2):320-6.

11. Ono H., Takahashi A., Ogoshi S., Furihata M., Ohtsuki Y. Relationship between H-ras p21 product and p53 protein or high-risk human papillomaviruses in esophageal cancer from Kochi, Japan. *Am J Gastroenterol*. 1994. Apr.; 89(4):646-7.

12. Shigaki H.1, Baba Y., Watanabe M., Miyake K., Murata A., Iwagami S., Ishimoto T., Iwatsuki M., Yoshida N., Baba H. KRAS and BRAF mutations in 203 esophageal squamous cell carcinomas: pyrosequencing technology and literature review. *Ann Surg Oncol*. 2013. Dec.; 20 Suppl 3:S485-91.

13. Shigaki H.1, Baba Y., Watanabe M., Murata A., Ishimoto T., Iwatsuki M., Iwagami S., Nosho K., Baba H. PIK3CA mutation is associated with a favorable prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013. May 1; 19(9):2451-9.

14. Song B., Cui H., Li Y., Cheng C., Yang B., Wang F., Kong P., Li H., Zhang L., Jia Z., Bi Y., Wang J., Zhou Y., Liu J., Wang J., Zhao Z., Zhang Y., Hu X., Shi R., Yang J., Liu H., Yan T., Li Y., Xu E., Qian Y., Xi Y., Guo S., Chen Y., Wang J., Li G., Liang J., Jia J., Chen X., Guo J., Wang T., Zhang Y., Li Q., Wang C., Cheng X., Zhan Q., Cui Y. Mutually exclusive mutations in NOTCH1 and PIK3CA associated with clinical prognosis and chemotherapy responses of esophageal squamous cell carcinoma in China. *Oncotarget*. 2016. Jan. 19; 7(3):3599-613.

15. Song Y., Li L., Ou Y., Gao Z., Li E., Li X., Zhang 5, Wang J., Xu L., Zhou Y., Ma X., Liu L., Zhao Z., Huang X., Fan J., Dong L., Chen G., Ma L., Yang J., Chen L., He M., Li M., Zhuang X., Huang K., Qiu K., Yin G., Guo G., Feng Q., Chen P., Wu Z., Wu J., Ma L., Zhao 6, Luo L., Fu M., Xu B., Chen B., Li Y., Tong T., Wang M., Liu Z., Lin D., Zhang X., Yang H., Wang J., Zhan Q. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature*. 2014 May 1; 509(7498):91-5.