

Северо-Западный государственный медицинский  
университет имени И. И. Мечникова

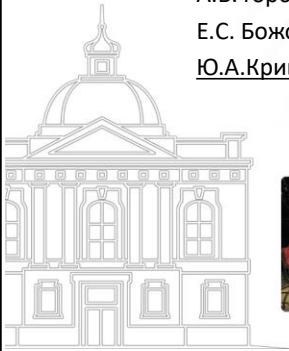


Транскриптомный анализ фолликулярной лимфомы:  
механизмы подавления противоопухолевого ответа

А.В. Горбунова

Е.С. Божокина

Ю.А.Криволапов



Москва  
23 апреля 2021 г.

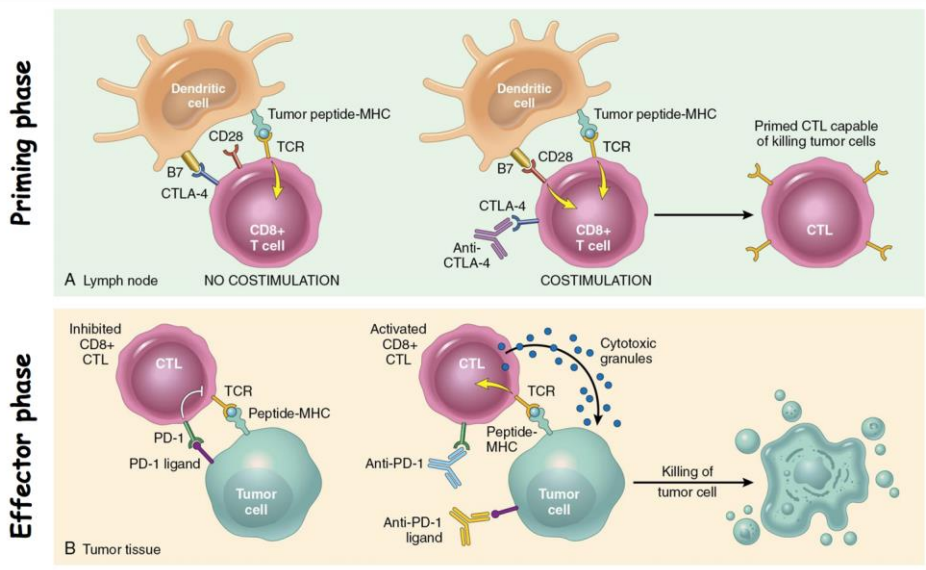
Работа поддержана грантом РФФИ № 17-54-33051 (ОНКО-а)  
"Анализ взаимодействия опухоли и микроокружения на  
уровне одиночных клеток при фолликулярной лимфоме"

- Клинические испытания ингибитора контрольных точек иммунного ответа ниволумаба показали низкую эффективность анти-PD-1 терапии у пациентов с фолликулярной лимфомой по сравнению с классической лимфомой Ходжкина.
- Общий показатель объективного ответа — 40 % при ФЛ и 87 % при КЛХ

Lymphoma	Agent	Phase	Disease setting	No. of pts	Response
cHL	Nivolumab	I	r/r HL	23	OR87% CR17% PR70% SD13%
FL	Nivolumab	I	r/r lymphoid malignancies	81 10FL	ORR 40% CR 10% PR 30% SD 60%

Lesokhin AM et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. J Clin Oncol. 2016 Aug 10;34(23):2698-704.

## Механизм действия ингибиторов контрольных точек иммунного ответа



## Цель и задачи исследования

Цель исследования — изучить механизмы подавления противоопухолевого иммунного ответа при фолликулярной лимфоме

Задачи —

- провести полнотранскриптомный анализ образцов опухолевой ткани пациентов с фолликулярной лимфомой в сравнении с контрольными образцами лимфоузлов с реактивной фолликулярной гиперплазией
- выявить сигнальные пути, связанные с иммунным ответом, функционирование которых изменено в опухоли и ее микроокружении
- выявить потенциальные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами иммунных контрольных точек при фолликулярной лимфоме

## Криобанк Санкт-Петербургского городского центра дифференциальной диагностики лимфаденопатий

Количество образцов в криоархиве	
Всего	2366
Лимфомы	1253



## Материалы

Биопсийный материал каждого пациента был разделен на две неравные части:

- фиксация в 10 % нейтральном формалине (> 75 % объема ткани)
- криоконсервация

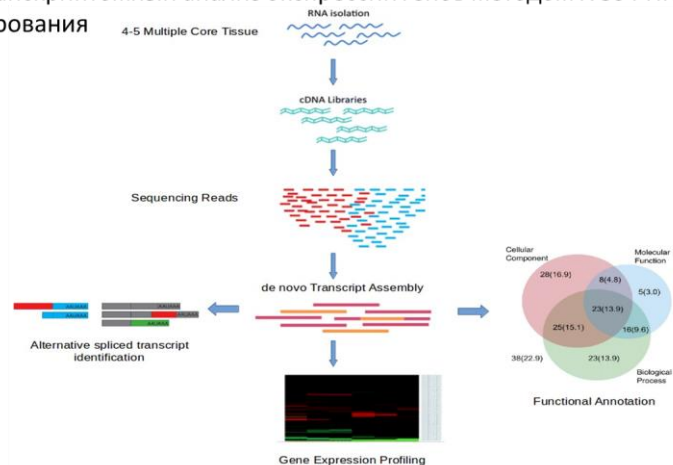
В исследование включено 48 образцов:

- 38 фолликулярная лимфома G1-2 и G3a/b
- 10 лимфоузлов с реактивной фолликулярной гиперплазией по данным гистологического и иммуногистохимического исследований биоптатов лимфатических узлов

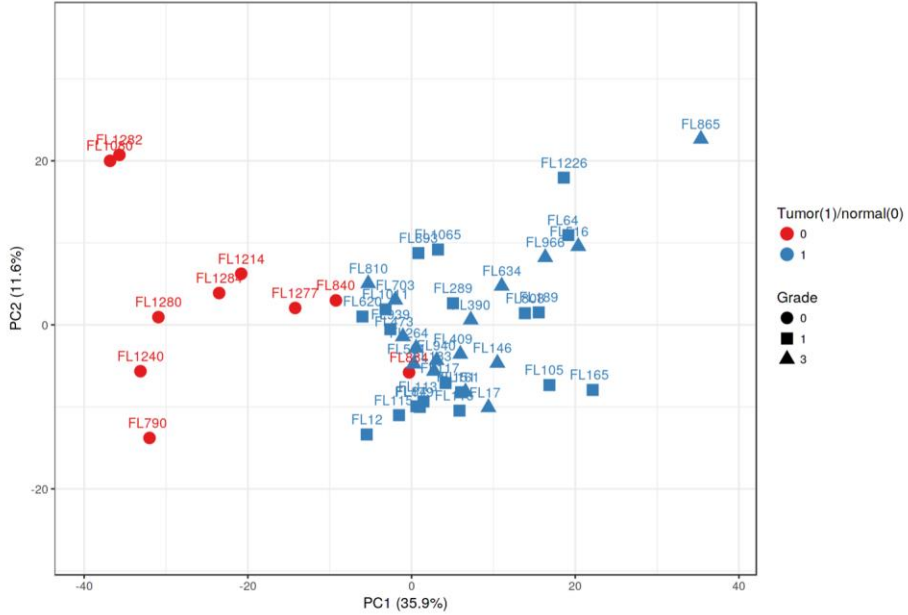
У всех пациентов получено информированное согласие на использование образцов для научных исследований

## Методы

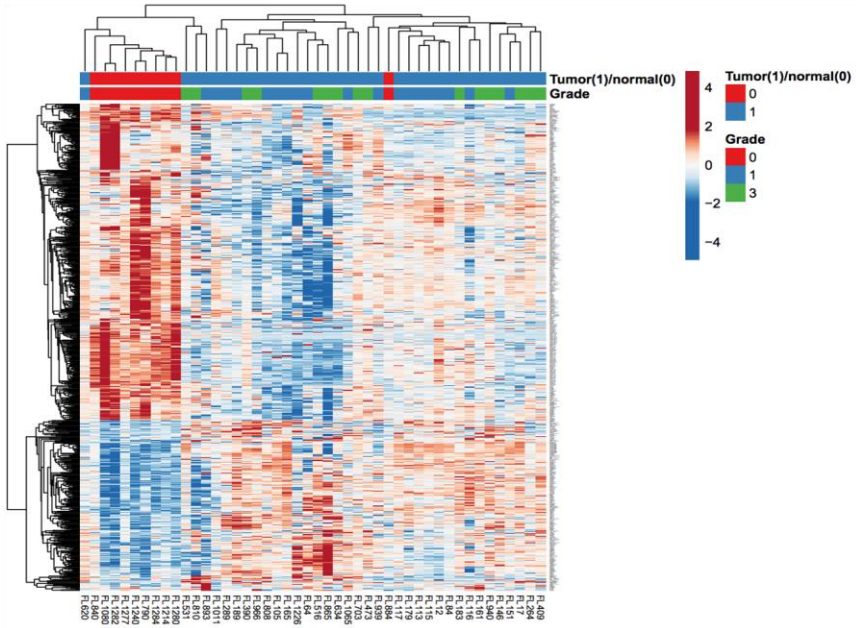
- гистологическое исследование биоптата
- иммуногистохимическое исследование
- молекулярно-генетическое исследование перестроек IGH, IGL, TCR и t(14,18) по протоколу BIOMED2
- полнотранскриптомный анализ экспрессии генов методом NGS РНК-секвенирования

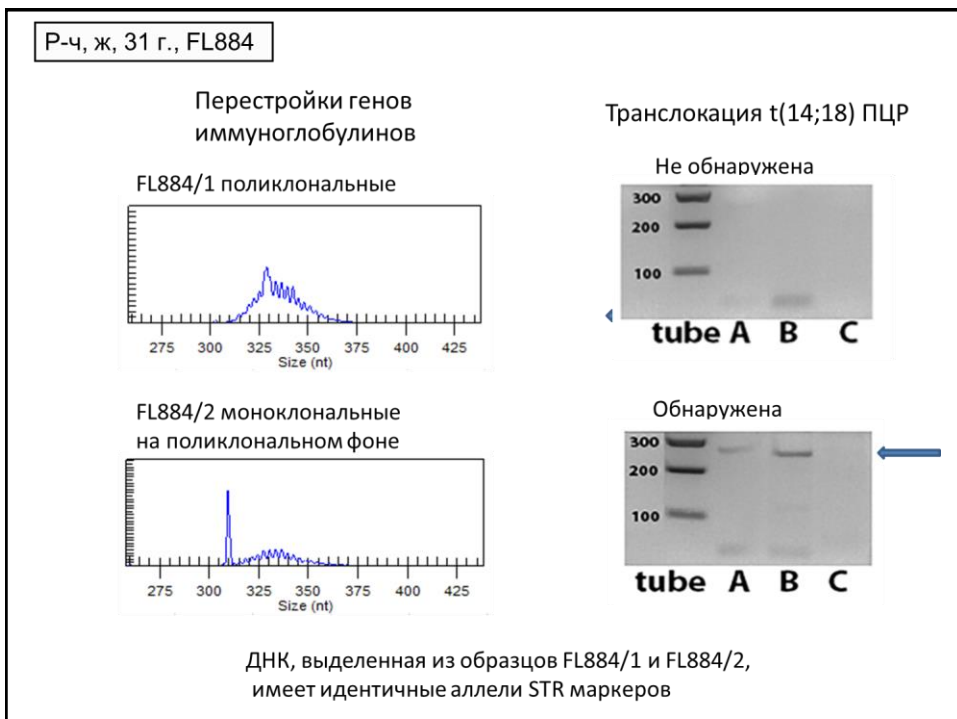
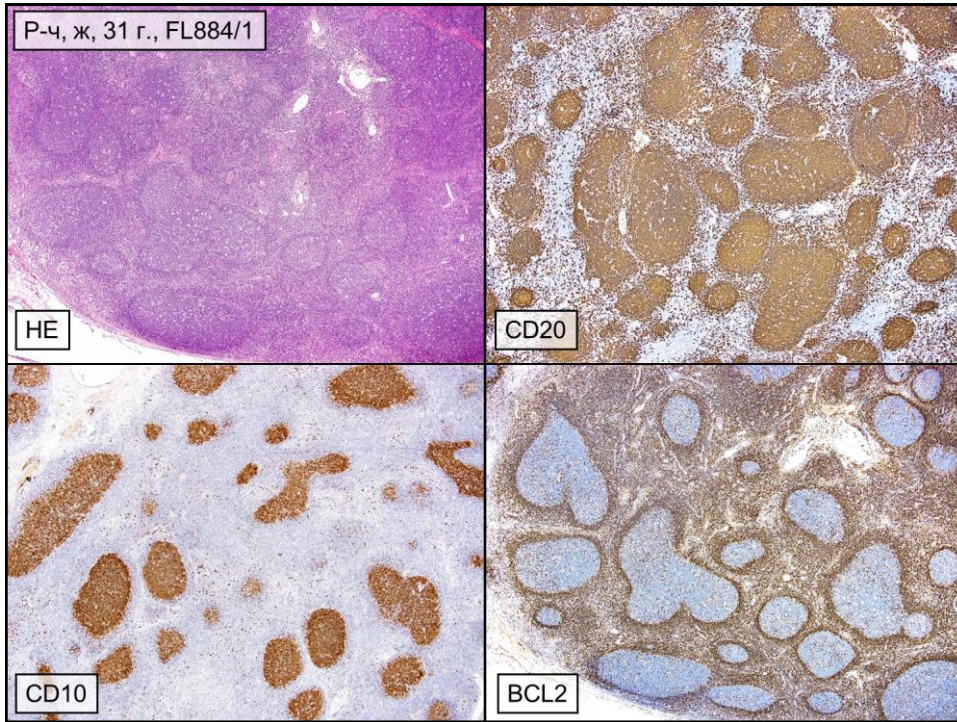


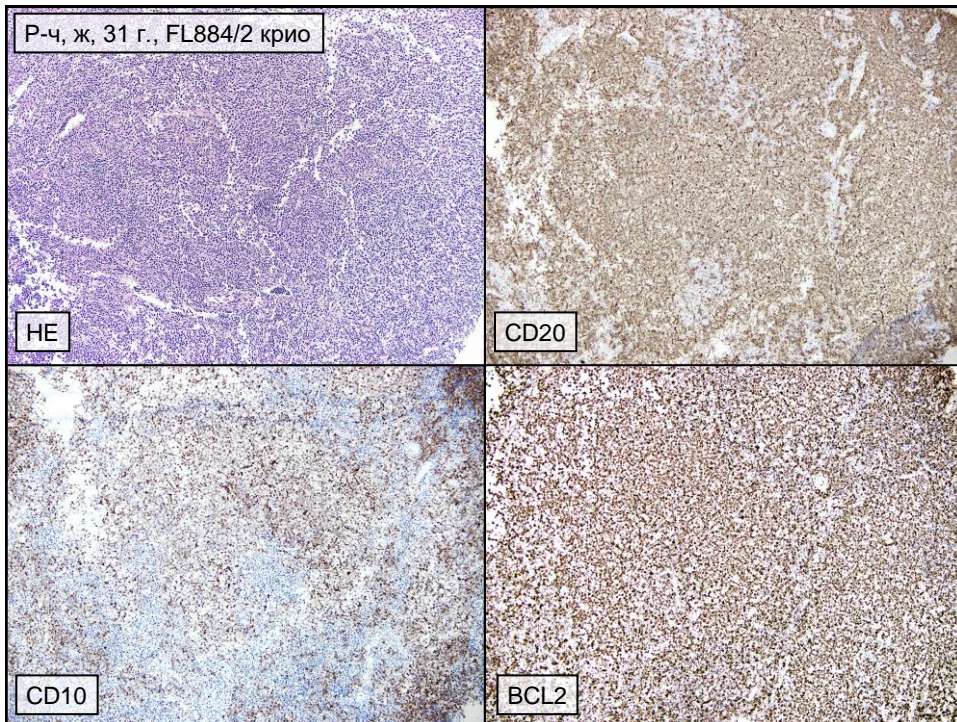
Анализ методом главных компонент



Иерархическая кластеризация







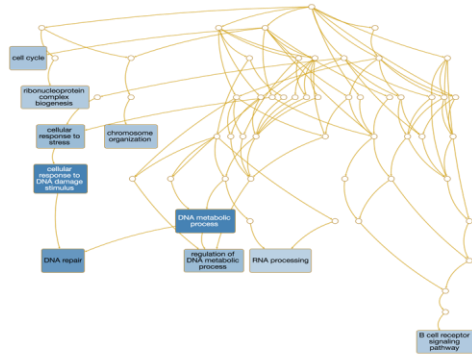
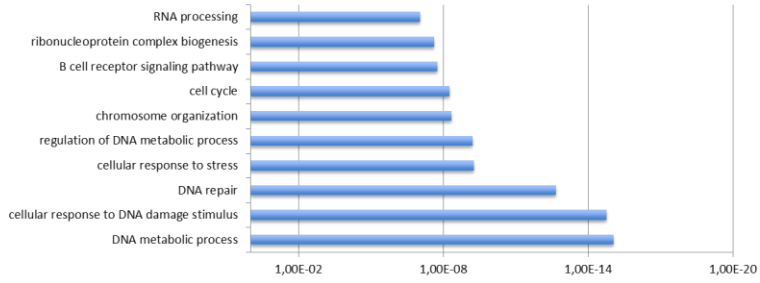
## Дифференциальная экспрессия генов

Полнотранскриптомный анализ РНК-секвенированием позволил количественно оценить уровень экспрессии каждого из 25000 генов.

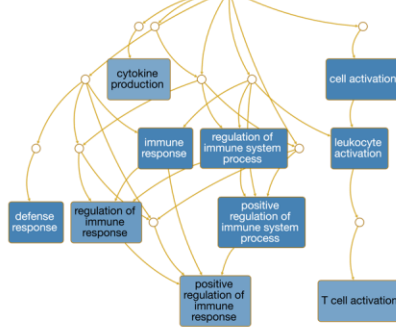
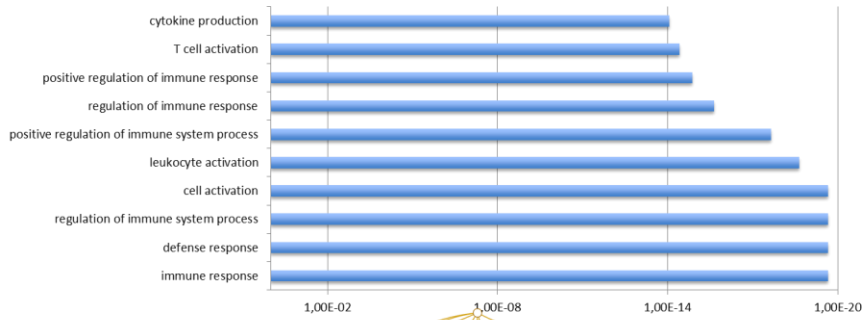
Проведен статистический анализ различий по уровню экспрессии генов в образцах из опухолевой (ФЛ) и контрольной групп :

- 997 генов, экспрессия которых статистически достоверно различается в опухолевых и контрольных образцах
- 430 генов с повышенной экспрессией при фолликулярной лимфоме (в том числе, известные ранее гены: BCL2, BCL6, BCL7A, BLK, BTK, CD79A, CD79B, PAX5)
- 567 генов с пониженной экспрессией

### Активированные сигнальные пути в ФЛ



### Подавленные сигнальные пути в ФЛ





## Активация Т-лимфоцитов

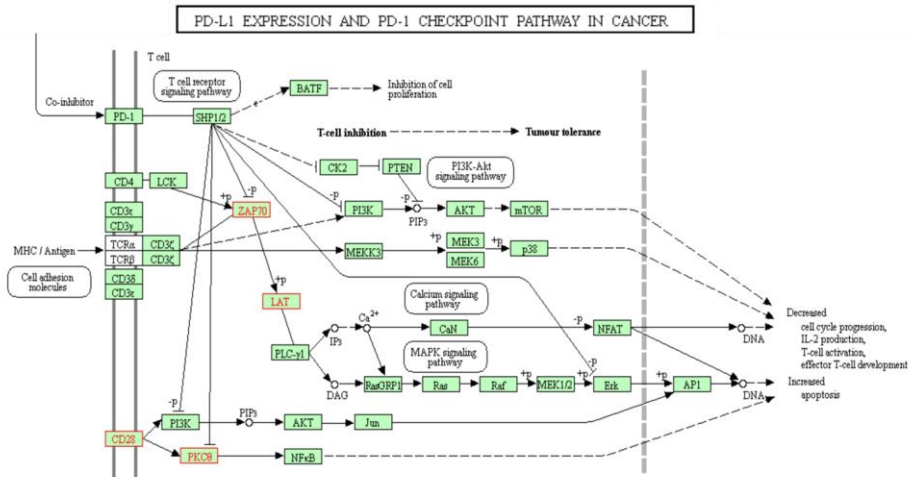
Gene Symbol	Gene Name
BCL11B	BCL11B, BAF complex component
CAMK4	calcium/calmodulin dependent protein kinase IV
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2
CCR7	C-C motif chemokine receptor 7
CD28	CD28 molecule
CLECT7A	C-type lectin domain containing 7A
DPP4	dipeptidyl peptidase 4
FCER1G	Fc fragment of IgE receptor Ig
GATA3	GATA binding protein 3
GRAP2	GRB2 related adaptor protein 2
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
IL15	interleukin 15
IL23R	interleukin 23 receptor
IL6R	interleukin 6 receptor
IL7R	interleukin 7 receptor
IRF1	interferon regulatory factor 1
ITK	IL2 inducible T cell kinase
LAT	linker for activation of T cells
LEF1	lymphoid enhancer binding factor 1
PRKCO	protein kinase C theta
RUNX2	runt related transcription factor 2
SPN	sialophorin
TCF7	transcription factor 7
THEMIS	thymocyte selection associated
TMGD2	transmembrane and immunoglobulin domain containing 2
TNFSF13B	TNF superfamily member 13b
VSIR	V-set immunoregulatory receptor
XBP1	X-box binding protein 1
ZAP70	zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70

Один из наиболее подавленных при ФЛ сигнальных путей контролирует активацию Т-лимфоцитов.

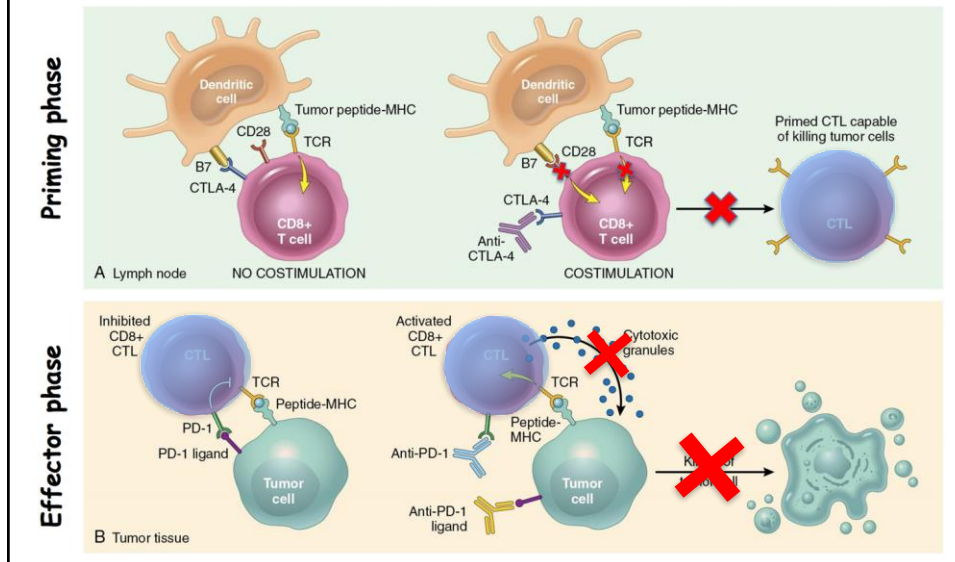
Экспрессия 29 генов из этой функциональной группы понижена при ФЛ.

Некоторые из них (LAT и BCL11B), как известно, ассоциированы с синдромом приобретенного иммунодефицита

## Анти-PD1 терапия и сигнальный путь активации Т-лимфоцитов в ФЛ



## Анти-PD1 терапия и сигнальный путь активации Т-лимфоцитов

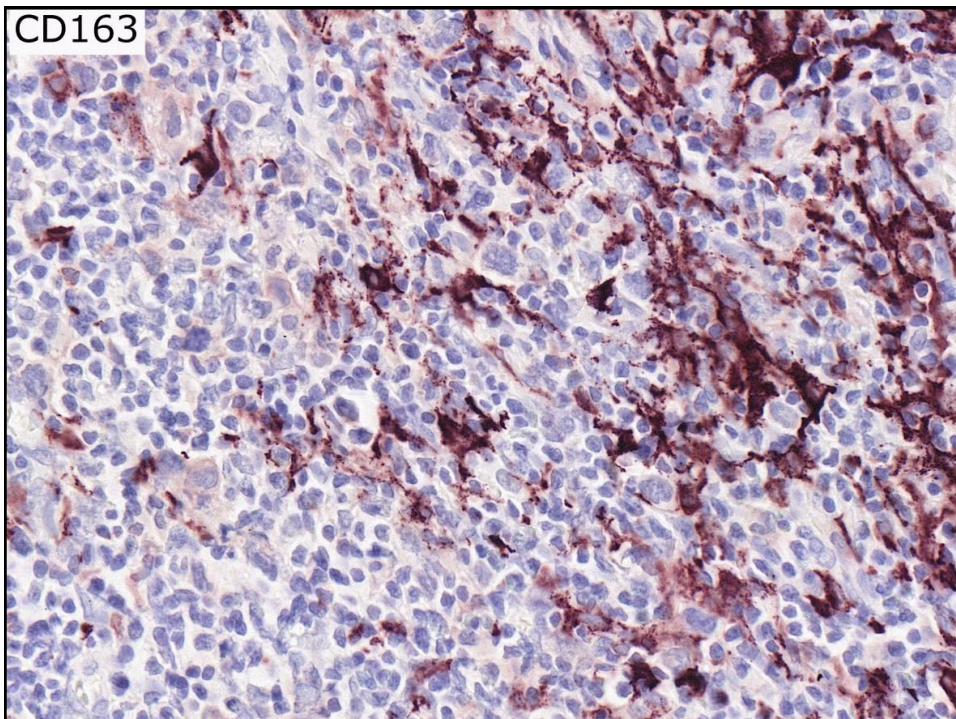


## Выводы

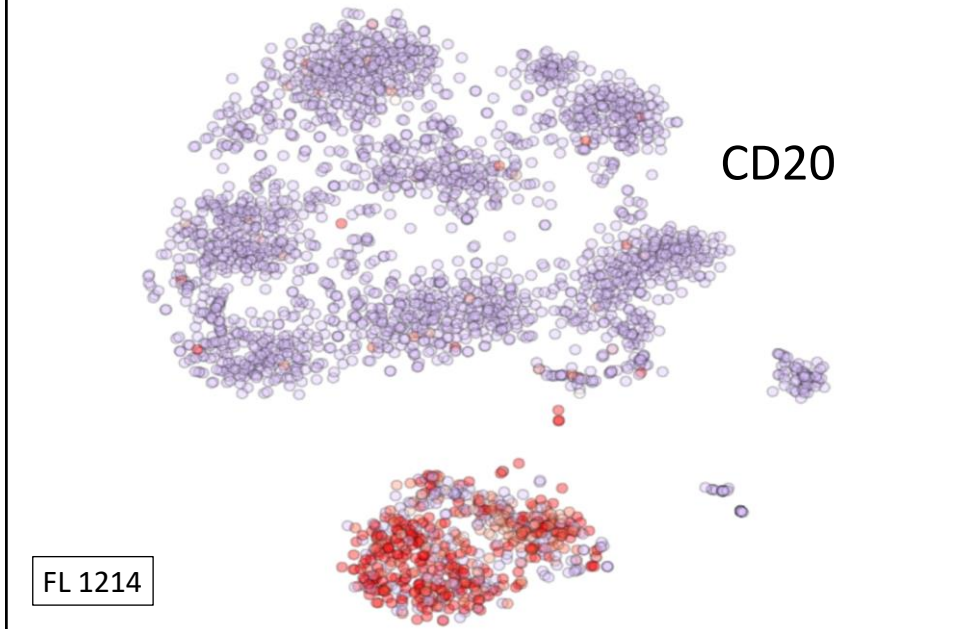
- Полученные данные позволяют предположить, что при фолликулярной лимфоме наиболее значимым механизмом подавления противоопухолевого иммунного ответа является нарушение активации Т-лимфоцитов
- Уровень экспрессии ключевых генов, контролирующих активацию Т-клеток, прежде всего CD28, потенциально может быть одним из биомаркеров, имеющих прогностическое значение в отношении эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа при фолликулярной лимфоме

## направления дальнейших исследований

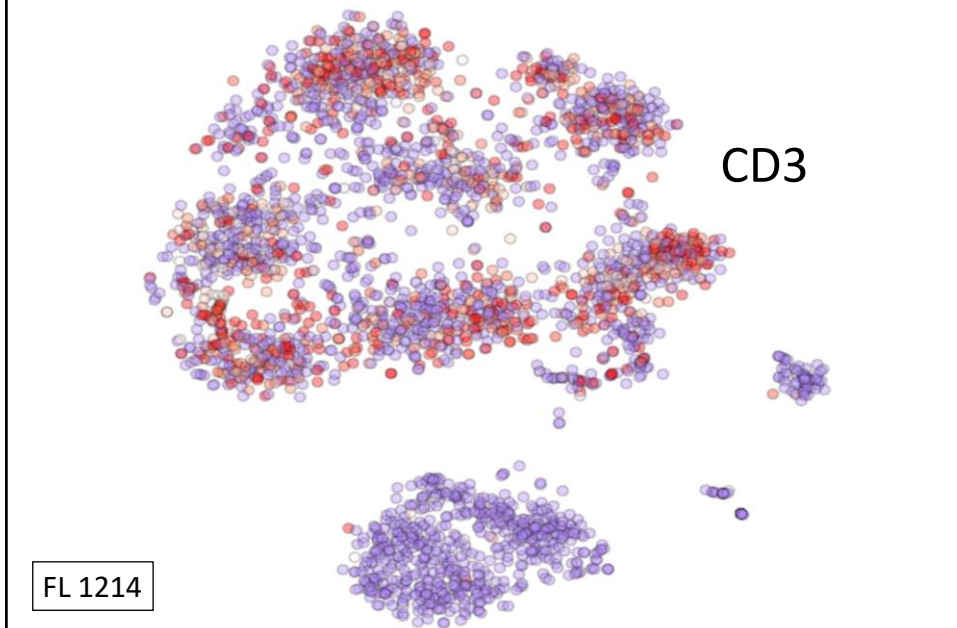
- мультиплексные иммуногистохимические исследования
- раздельное одноклеточное полнотранскриптомное секвенирование



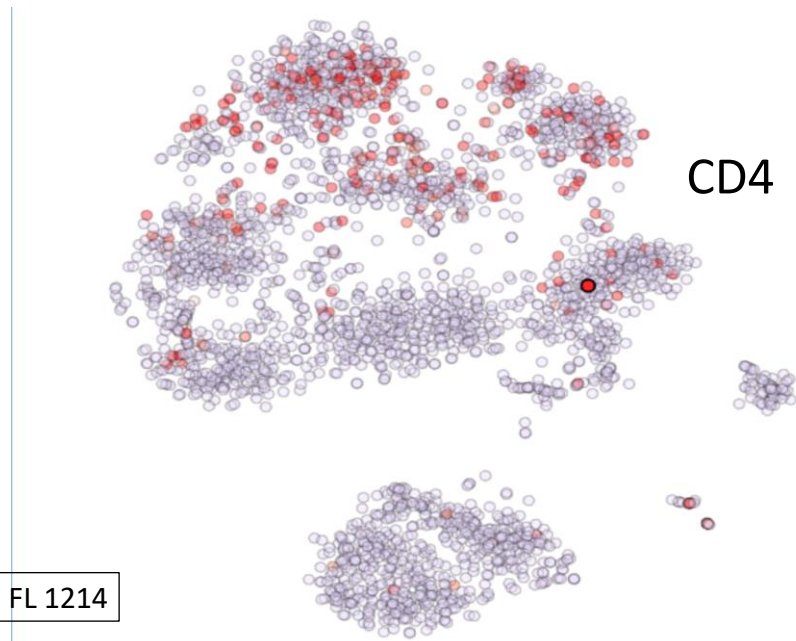
## Раздельное одноклеточное РНК-секвенирование



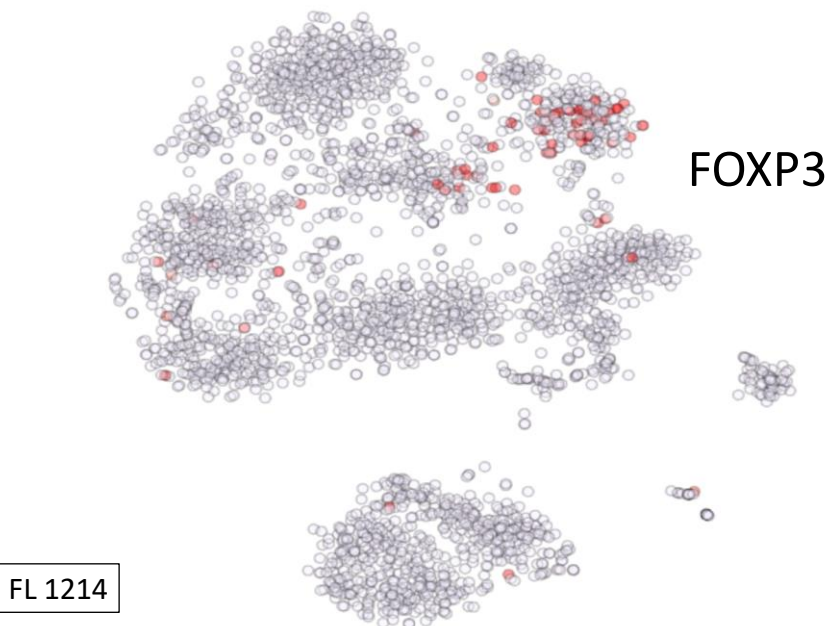
## Раздельное одноклеточное РНК-секвенирование



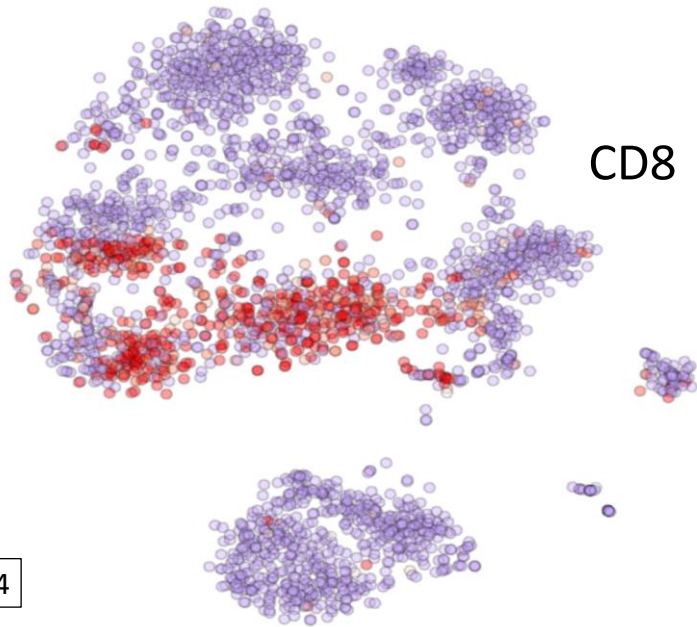
## Раздельное одноклеточное РНК-секвенирование



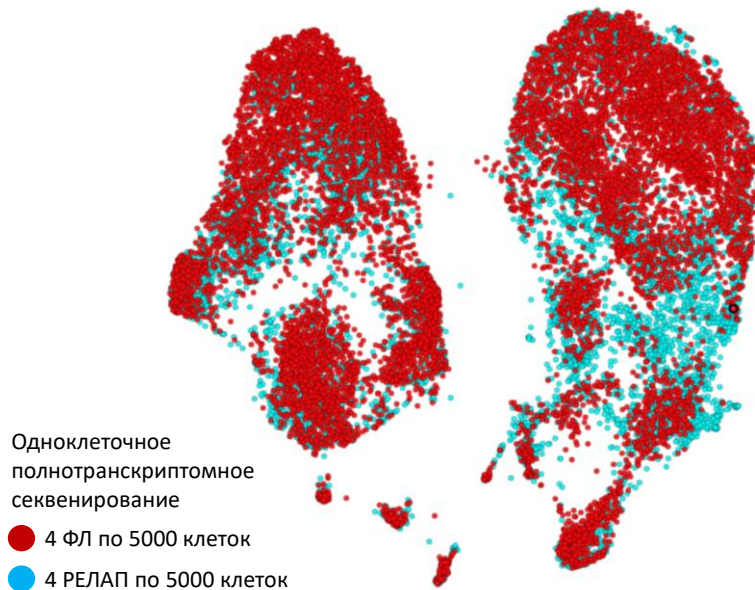
## Раздельное одноклеточное РНК-секвенирование



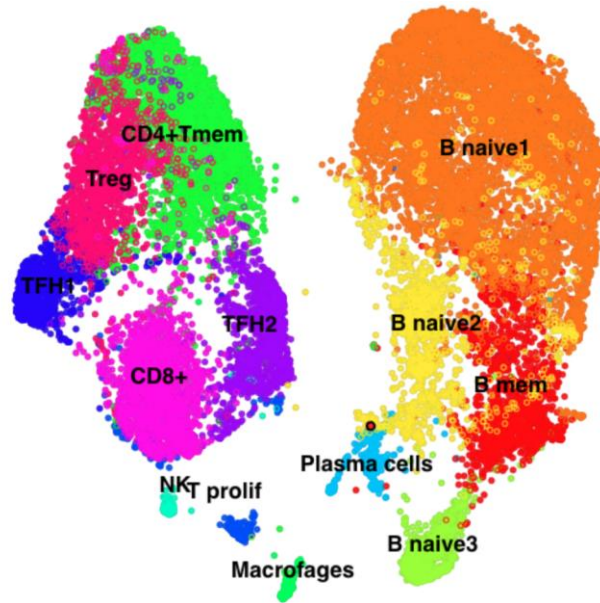
## Раздельное одноклеточное РНК-секвенирование



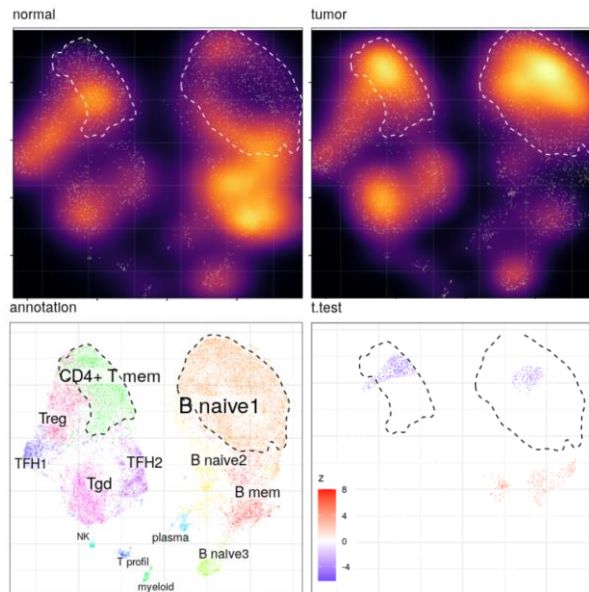
## Анализ клеток методом главных компонент по общему профилю экспрессии



Аннотация кластеров  
на основе экспрессии клеточных маркеров



Различия ФЛ и РЕЛАП  
по количеству клеток в кластерах



## Дифференциальная экспрессия генов в субпопуляции Т-клеток, характерной для ФЛ, по сравнению с контрольными образцами

Name	Log2(fc)	Z-score ▲
<a href="#">JUN</a>	-1.3519176310597436	-24.31617035904341
<a href="#">FOS</a>	-0.8904406833083665	-23.4678827206255
<a href="#">JUNB</a>	-0.7930729461904972	-22.402179848268677
<a href="#">DUSP1</a>	-1.2040176397570863	-21.653663639580376
<a href="#">IER2</a>	-1.1683356597405556	-20.441192614086443
<a href="#">FOSB</a>	-0.6804728793778079	-17.764458142547955
<a href="#">TXNIP</a>	-1.5795960807121867	-17.623696326866053
<a href="#">BTG2</a>	-1.214706887041919	-16.00878723714641
<a href="#">GADD45B</a>	-1.3049469933379434	-15.861087604818213
<a href="#">DNAJB1</a>	-0.9707629854885764	-14.63822176401056
<a href="#">ACTB</a>	-0.40239446524451505	-14.048724277245082
<a href="#">CD69</a>	-0.7133706570625555	-13.949624954576462
<a href="#">SRSF7</a>	-0.5986302116018113	-13.317226761334085

