

EZH2 – НОВАЯ МИШЕНЬ ТАРГЕНТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

Куневич Е.О.¹, Волошин С.В.^{1,2}, Мартынкевич И.С.¹, Мотыко Е.В.¹, Барам Д.В.¹, Кувшинов
А.Ю.¹, Сидоркевич С.В.¹

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме

Введение. Ключевым цитогенетическим маркером фолликулярной лимфомы (ФЛ) является реципрокная транслокация t(14;18)(q32.3;q21.3), выявляемая у 80-85% пациентов. Однако для развития ФЛ необходимы дополнительные генетические события, среди которых мутации в гене *EZH2*. Изменение парадигмы терапевтических подходов при ФЛ, включение новых таргетных препаратов в программы лечения рецидивирующих и рефрактерных форм заболевания предполагает выявление новых предикторов эффективности терапии, таких как мутационный статус гена *EZH2*. Разработанный недавно пероральный селективный ингибитор *EZH2* (тазаметостат) продемонстрировал высокую эффективность в лечении рецидивирующей и рефрактерной ФЛ.

Целью исследования было определить частоту встречаемости мутаций гена *EZH2* у пациентов с ФЛ, используя секвенирование по Сэнгеру и секвенирование следующего поколения (NGS).

Материалы и методы. В исследование включено 111 пациентов старше 18 лет с впервые подтвержденной фолликулярной лимфомой. Мутационный статус 16 экзона гена *EZH2* оценивался с помощью секвенирования по Сэнгеру (n = 111). Анализ NGS проводился на платформе NextSeq (Illumina, USA) методом парно-концевого чтения с использованием панели зондов к 118 генам у 25 пациентов. Перестройки генов *BCL2*, *BCL6*, а также del17p/*TP53*, определяли методом флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), которые были оценены у 105 пациентов. Полученные данные анализировались с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26, R version 4.2.2.

Результаты. Частота мутаций согласно результатам секвенирования по Сэнгеру составила 17%, согласно данным NGS – 12%. У всех больных отмечалась миссенс-мутация

различной замены аминокислоты тирозин в 646 положении (p.Y646X). По результатам NGS наибольшая частота мутаций отмечалась в генах: *KMT2C* – 52%, *KMT2D* – 48%, *CREBBP* – 32%, *NOTCH2* – 32%, *GNAS* – 24%, *FAT1*, *ITPKB* и *KDR* – по 20%. Мутации гена *EZH2* были ассоциированы с 1-2 цитологическим типом, а также с мутациями в генах *CREBBP* ($p = 0,004$), *KMT2D* ($p = 0,032$) и *KDR* ($p = 0,026$).

Выводы. Частота мутаций гена *EZH2*, оцененная методами NGS и секвенирования по Сэнгеру, в российской когорте пациентов составляет 12-17%, что согласуется с данными международных исследований. Принимая во внимание относительно высокую частоту встречаемости, а также накопленные данные о патогенетической роли, мутации гена *EZH2* являются важным предиктором и одной из основных мишеней терапевтического воздействия у пациентов с ФЛ.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, эпигенетика, репрессивный комплекс поликомб 2 (PRC2), мутации гена *EZH2*, метилирование H3K27, секвенирование следующего поколения (NGS), таземетостат, таргетная терапия.

EZH2 IS A NEW TARGET TARGET IN FOLLICULAR LYMPHOMA: LITERATURE REVIEW AND OWN DATA

Kunevich E.O.¹, Voloshin S.V.^{1,2}, Martynkevich I.S.¹, Motyko E.V.¹, Baram D.V.¹, Kuvshinov A.Y.¹, Sidorkevich S.V.¹

¹*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint-Petersburg, Russia*

²*Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia,*

For correspondence: Kunevich Evgenii Olegovich, E-mail: kunevich17@gmail.ru

Abstract

Introduction. The key cytogenetic marker of follicular lymphoma (FL) is the reciprocal translocation t(14;18)(q32.3;q21.3), detected in 80-85% of patients. However, the development of FL requires additional genetic events, including mutations in the *EZH2* gene. Changing the paradigm of therapeutic approaches in FL, the inclusion of new targeted drugs in treatment programs for relapsed and refractory forms of the disease suggests the identification of new predictors of the effectiveness of therapy, such as the mutational status of the *EZH2* gene. A recently developed oral selective inhibitor of EZH2 (tazemetostat) has demonstrated high efficacy in the treatment of relapsed and refractory FL.

Aim. To determine the frequency of occurrence of mutations in the *EZH2* gene in patients with FL using Sanger sequencing and next generation sequencing (NGS).

Materials and methods. The study included 111 patients over 18 years of age with newly confirmed follicular lymphoma. The mutational status of exon 16 of the *EZH2* gene was assessed using Sanger sequencing (n = 111). NGS analysis was performed on the NextSeq platform (Illumina, USA) by paired-end reading using a panel of probes for 118 genes in 25 patients. Rearrangements of the *BCL2*, *BCL6*, and del17p/*TP53* genes were determined by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), which were evaluated in 105 patients. The obtained data were analyzed using IBM SPSS Statistics 26, R version 4.2.2 software.

Results. The frequency of mutations according to the results of Sanger sequencing was 17%, according to NGS – 12%. All patients had a missense mutation of the tyrosine amino acid substitution at position 646 (p.Y646X). According to the results of NGS, the highest mutation frequency was noted in the genes: *KMT2C* – 52%, *KMT2D* – 48%, *CREBBP* – 32%, *NOTCH2* – 32%, *GNAS* – 24%, *FAT1*, *ITPKB* and *KDR* – 20% each. *EZH2* gene mutations were associated with cytological type 1-2, as well as with mutations in the *CREBBP* (p = 0.004), *KMT2D* (p = 0.032), and *KDR* (p = 0.026) genes.

Conclusions. The mutation rate of the *EZH2* gene, estimated by NGS and Sanger sequencing, in the Russian cohort of patients is 12-17%, which is consistent with the data of international studies.

Taking into account the relatively high frequency of occurrence, as well as the accumulated data on the pathogenetic role, mutations in the *EZH2* gene are an important predictor and one of the main targets of therapeutic intervention in patients with FL.

Key words: follicular lymphoma, epigenetics, polycomb repressive complex 2 (PRC2), *EZH2* gene mutations, H3K27 methylation, next generation sequencing (NGS), tazemetostat, targeted therapy.

Введение

Фолликулярная лимфома (ФЛ) представляет собой неходжкинскую В-клеточную лимфому, возникающую из клеток герминальных центров (ГЦ) лимфатических фолликулов. Среди всех неходжкинских лимфом (НХЛ), ФЛ является второй по распространенности после диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) и наиболее частой среди индолентных лимфом.

В настоящий момент инициальное лечение ФЛ включает иммунохимиотерапию на основе анти-CD20 моноклональных антител, добавление которых к стандартным режимам химиотерапии значительно улучшило как показатели выживаемости, так и качество жизни пациентов. Но, несмотря на одобрение новых таргетных препаратов и внедрение альтернативных режимов терапии, сохраняется относительно высокая частота (10-30%) трансформации Рихтера, а ремиссии ФЛ в 15-20% носят неустойчивый характер. Все вышесказанное указывает на постоянную потребность во внедрении новых терапевтических подходов у данной категории пациентов.

Энхансер гомолога зесте 2 (EZH2) – ген, кодирующий одноименную гистонметилтрансферазу, участвующую в переносе метильных групп на гистоны H3. Входит в состав репрессивного комплекса поликомб 2 (PRC2), который относится к системе эпигенетической регуляции транскрипции. Фермент непосредственно блокирует транскрипцию генов, регулирующих пролиферацию и способствующих выходу В-клеток из ГЦ [1]. Мутации ферментативного SET-домена гена *EZH2*, связанные с усилением функции, встречаются примерно у 20% пациентов с ФЛ и ДВККЛ [2]. Данные мутации вызывают aberrантное триметилирование лизина в положении 27 гистона H3 (H3K27me3), а распространение метки H3K27me3 по целевым локусам приводит к эпигенетическому подавлению экспрессии генов [3]. Мутации гена *EZH2* обуславливают механизмы ускользания опухолевых клеток от иммунного надзора путем подавления презентации антигена и нарушения процессов хемотаксиса эффекторных клеток в микроокружение опухоли [5]. Учитывая определяющую роль *EZH2* в формировании ГЦ лимфатических фолликулов, а также зависимость активности мутантного *EZH2* от варианта аллеля дикого типа, терапевтическое нацеливание на активный центр фермента является новой стратегией в лечении данной категории пациентов. Таземетостат – первый селективный ингибитор *EZH2* в настоящий момент проходит клинические испытания в лечении различных типов НХЛ. В 2020 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило применение таземетостата у пациентов с рефрактерной и/или рецидивирующей (р/р) ФЛ, получавших до этого 2 и более линии терапии.

Функции гена *EZH2* и его прогностическая роль у пациентов с фолликулярной лимфомой

Ген *EZH2* картирован на хромосоме 7q36.1 и кодирует гистонметилтрансферазу, структурно состоящую из С-концевого каталитического SET-домена, соседнего богатого цистеином домена CXC, двух SANT-доменов, доменов pcRBD и некоторых других промежуточных доменов [6]. Нормальная функция *EZH2* в В-клетках ГЦ состоит, как уже было сказано, в подавлении экспрессии набора генов, которые высоко транскрибируются в наивных В-клетках [7]. К генам, активность которых регулируется *EZH2*, в первую очередь относятся гены терминальной дифференцировки (*PRDM1*, *IRF4*, *XBPI*) и негативные регуляторы клеточного цикла (*CDKN1A*, *CDKN1B*) [3]. Таким образом, *EZH2*-опосредованное подавление экспрессии данных генов временно приостанавливает процессы дифференцировки В-клеток.

У пациентов с ФЛ мутации гена *EZH2* впервые были описаны в 2011 г [3]. Чаще всего это миссенс-мутации замены аминокислоты тирозина на фенилаланин в 641 положении (Туг641 или дикий тип) в SET домене, приводящие к усилению каталитической активности всего комплекса PRC2. Недавно у пациентов с ФЛ были описаны мутации *EZH2* в области 16 и 18 экзонов (Y646X, A682G и A692V), встречающиеся с частотой 25%, и некоторые другие, более редкие варианты аминокислотных замен (K634E, V637A и V679M) [9].

Сравнение каталитической активности аллелей гена *EZH2* дикого и мутантного (Y641) типов показало, что продукт гена дикого типа обладает наибольшей ферментативной активностью в отношении моно-метилирования H3K27me1, которая постепенно снижается для меток ди- и триметилирования (H3K27me2/3). Напротив, вариант Y641 обладает максимальной ферментативной активностью в реакции триметилирования H3K27me3 [10]. Таким образом, комплексы PRC2, содержащие мутантную форму белка *EZH2*, неактивны в отношении неметилированных участков гистонов и функциональны только в присутствии *EZH2* дикого типа [11].

В 2015 г. на основании анализа мутаций 74 генов по данным секвенирования у 154 пациентов с ФЛ был разработан биологический прогностический индекс m7-FLIPI, стратифицирующий пациентов на группы высокого и низкого риска и включающий мутационный статус 7 генов (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, *CARD11*), а также клинические характеристики (статус ECOG и критерии FLIPI). В однофакторном анализе мутации гена *EZH2* (ОР 0,46, ДИ: 0,22-0,93; $p = 0,030$) были ассоциированы с более длительной выживаемостью. По данным многофакторного регрессионного анализа наличие мутаций гена *EZH2* приводило к значительному улучшению как выживаемости, свободной от неудач лечения, так и общей выживаемости, но только среди пациентов с FLIPI высокого

риска. Исследование имело ограничение, так как достоверность оценки m7-FLIPI была продемонстрирована только у пациентов, получавших ритуксимаб в комбинации с химиотерапией по протоколу CHOP или CVP [12].

У пациентов из исследования GALLIUM (NCT01332968) было продемонстрировано, что индекс m7-FLIPI имеет прогностическое значение только у пациентов, получавших в качестве химиотерапии комбинацию CHOP/CVP, но не бендамустин. Наличие мутации гена *EZH2* у больных, получивших CHOP/CVP в комбинации с иммунотерапией, приводило к более высокой выживаемости без прогрессирования (ВБП). Так же, следует отметить, что индекс m7-FLIPI не является прогностическим для пациентов с ФЛ, принимающих ритуксимаб без химиотерапии [13], что может указывать на тот факт, что валидность подобных инструментов актуальна только в рамках определенных клинических подходов.

В анализе, включившем 159 пациентов с ФЛ из исследования PRIMA (NCT00140582), оценивалось влияние мутации и усиление функции гена *EZH2* на ВБП. Наличие изменения (усиление и/или мутации) в *EZH2* оказывало благоприятное влияние на ВБП ($p = 0,026$). У пациентов без изменений гена *EZH2* средняя ВБП составила 58 месяцев, тогда как у пациентов с изменением статуса *EZH2* средняя ВБП не была достигнута. Скорость 2-летнего прогрессирования в группе пациентов с изменением функциональной активности гена *EZH2* составила 15% (95% ДИ: 9-28%) и увеличивалась до 31% (95% ДИ: 23-41%) у пациентов с нормальным геном *EZH2* ($p = 0,036$). В многомерной регрессионной модели Кокса, которая включала мутационный статус *EZH2* и расчет индекса FLIPI, наличие изменений гена *EZH2* оставалось единственным независимым фактором, значимо связанным с лучшей ВБП (ОШ 0,58, 95% ДИ: 0,36-0,93, $p = 0,025$) [14].

Терапевтические возможности таргетного воздействия на *EZH2*

С 2012 г. по настоящее время было разработано несколько специфичных SAM-конкурентных ингибиторов *EZH2*, способных блокировать как мутантную форму белка, так и вариант дикого типа [15]. Данные молекулы подавляют преимущественно реакции ди- и триметилирования H3K27, что приводит реактивации генов-мишеней комплекса PRC2.

На данный момент шесть SAM-конкурентных ингибиторов (CPI-0209, CPI-1205, таземетостат (EPZ-6438), GSK2816126, PF-06821497 и DS-3201 – двойной ингибитор *EZH1* и *EZH2*) проходят I-III фазу клинических испытаний при лимфопролиферативных новообразованиях и солидных опухолях. Согласно результатам открытого многоцентрового исследования II фазы таземетостата у 99 пациентов с р/р ФЛ частота объективного ответа у больных с мутацией гена *EZH2* составила 69% (95% ДИ: 53-82%), а в группе гена дикого типа – 35% (95% ДИ: 23-49%). Средняя продолжительность ответа равнялась 10,9 месяцев (95%

ДИ: 7,2-нет оценки) в группе с мутацией *EZH2* и 13,0 месяцев (95% ДИ: 5,2-нет оценки) в группе дикого типа. Побочные эффекты 3 или более тяжелой степени, связанные с лечением, включали тромбоцитопению (3%), нейтропению (3%) и анемию (2%). Смертей, связанных с лечением, не было [16]. На основании результатов данного исследования таземетостат (TAZVERIK, Epizyme, Inc.) получил ускоренное одобрение FDA в июне 2020 г. для лечения взрослых пациентов с p/p ФЛ. В соответствии с недавним обновлением препарат может использоваться при рецидиве ФЛ в независимости от мутационного статуса гена *EZH2*.

По результатам аналогичного исследования II фазы с включением 17 пациентов с p/p ФЛ, инициированного в Японии, частота объективного ответа у пациентов с мутацией гена *EZH2* составила 76,5%, при частоте полных ответов 35,3%. Медиана беспрогрессивной выживаемости не была достигнута. Наиболее частыми побочными эффектами были дисгевзия (50%) и лимфопения (25%). Три пациента прекратили прием препарата в связи с развитием серьезных нежелательных явлений, таких как атипичная пневмония, дисгевзия и мышечная спастичность [17].

Таким образом, учитывая актуальность исследований в изучении механизмов регуляции транскрипции генов, в частности влияния мутаций гена *EZH2* на прогноз у пациентов с ФЛ, а также значительный разброс в выявляемости данных генетических изменений согласно результатам международных исследований (7-28%) [2, 3, 9, 11] и большой спектр выявленных мутаций, нами был проведен анализ по изучению частоты мутаций гена *EZH2* в российской когорте больных ФЛ с применением двух современных методов молекулярно-генетической диагностики: секвенирование следующего поколения (NGS) и секвенирование по Сэнгеру.

Целью настоящего исследования было определить частоту встречаемости мутаций гена *EZH2* в российской когорте пациентов с использованием различных современных методов молекулярной диагностики (секвенирование по Сэнгеру, NGS).

Материалы и методы

В исследование включено 111 пациентов старше 18 лет с морфологически подтвержденной фолликулярной, проходивших лечение в гематологической клинике ФГБУ РосНИИГТ ФМБА и других лечебных учреждений г. Санкт-Петербурга в период с 2007 по 2022 гг. Средний возраст пациентов составил 55,2 лет (95% ДИ: 52,5-57,9; медиана 56,0 лет), среди которых было 38 мужчин (34%) и 73 (66%) женщины, соотношение М:Ж равнялось 1,9:1 соответственно. Медиана наблюдения составила 34,3 месяца (с максимальным периодом наблюдения 15 лет).

Мутационный статус 16 экзона гена *EZH2* был оценен у 111 (100,0%) пациентов с

помощью секвенирования по Сэнгеру в 3 этапа: выделение геномной ДНК из периферической крови, амплификация 16 экзона гена *EZH2*, секвенирование по Сэнгеру. Анализ секвенирования следующего поколения проводился на платформе NextSeq (Illumina, USA) методом парно-концевого чтения с использованием кастомной панели зондов производства Roche (лимфоидная таргетная NGS панель, таблица 1) у 25/111 (22,5%) пациентов. Клиническая значимость выявленных мутаций оценивалась с помощью баз данных COSMIC, ClinVar, gnomAD с применением *in silico* анализа (Cscape, Cancer Genome Interpreter, SNPs&Go). Перестройки генов *BCL2*, *BCL6*, а также *del17p/TP53*, определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), которые были оценены у 105/111 (94,6%) пациентов.

Таблица 1

Лимфоидная таргетная NGS панель

<i>ABL1</i>	<i>AKT3</i>	<i>ALK</i>	<i>APC</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ASXL1</i>	<i>ATM</i>	<i>ATRX</i>	<i>B2M</i>
<i>BCL2</i>	<i>BCOR</i>	<i>BCORL1</i>	<i>BCR</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BRAF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BTB</i>
<i>CALR</i>	<i>CARD11</i>	<i>CBL</i>	<i>CCND1</i>	<i>CD58</i>	<i>CD79B</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CDX2</i>	<i>CEBPA</i>
<i>CIITA</i>	<i>CREBBP</i>	<i>CSF3R</i>	<i>CUX1</i>	<i>DDX3X</i>	<i>DEK</i>	<i>DIS3</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>EP300</i>
<i>ETV6</i>	<i>EZH2</i>	<i>FAT1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>FLT3</i>	<i>GATA1</i>	<i>GATA2</i>	<i>GJB2</i>	<i>GNA13</i>
<i>GNAS</i>	<i>H1-1</i>	<i>HRAS</i>	<i>ID3</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IKZF3</i>	<i>IRF4</i>
<i>ITPKB</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>KDR</i>	<i>KIT</i>	<i>KLF2</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KMT2C</i>
<i>KMT2D</i>	<i>KRAS</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>MEF2B</i>	<i>MGA</i>	<i>MPL</i>	<i>MSN</i>	<i>MYC</i>	<i>MYD88</i>
<i>NF1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>NSD2</i>	<i>PDGFR A</i>	<i>PHF6</i>	<i>PIK3CB</i>
<i>PIM1</i>	<i>PKHD1</i>	<i>PLCG2</i>	<i>POT1</i>	<i>PRDM1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>PTEN</i>	<i>PTPN11</i>	<i>PTPRD</i>
<i>RAD21</i>	<i>RB1</i>	<i>RHOA</i>	<i>RPS15</i>	<i>RUNX1</i>	<i>RYR1</i>	<i>SAMHD1</i>	<i>SETBP1</i>	<i>SF3B1</i>
<i>SH2B3</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>SMC1A</i>	<i>SMC3</i>	<i>SOCS1</i>	<i>SRSF2</i>	<i>STAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT6</i>
<i>SUZ12</i>	<i>SYK</i>	<i>TENT5C</i>	<i>TET2</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>TP53</i>	<i>U2AF1</i>	<i>WT1</i>	<i>XPO1</i>
<i>ZRSR2</i>								

Полученные данные анализировались с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26.0.0.0, R version 4.2.2. Все количественные переменные проверены на нормальность распределения. Количественные данные анализировались с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни в зависимости от типа распределения. Независимые категориальные данные сравнивали с использованием таблиц сопряженности.

Уровень значимости считали равным $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Частота мутаций гена *EZH2*, оцененная с помощью секвенирования по Сэнгеру, составила 17% (19/111). У всех больных отмечались различные варианты миссенс-мутаций замены тирозина в 646 положении (p.Y646X). У пациентов с 3А-3В цитологическим типов достоверно реже выявлялась мутация гена *EZH2*, частота которой в данной группе составила 11% (2/19), против 37% (34/92) у пациентов с вариантами гена дикого типа, $p = 0,025$. По другим параметрам обе группы не имели статистически значимых различий: возраст ($p = 0,125$), поражение костного мозга ($p = 1,0$), экстранодальные поражения ($p = 0,785$), стадия Ann Arbor ($p = 1,0$), $\beta 2$ -микроглобулин ($p = 0,379$), ЛДГ ($p = 0,355$). У пациентов с мутацией гена *EZH2* чаще отмечалась транслокация t(14;18) – 60% (95% ДИ: 24,5-71,1) против 39% (95% ДИ: 23,2-43,2) в группе дикого типа, однако различия статистически не значимы, $p = 0,159$. Частота наличия перестроек генов *BCL6* (FISH) и del17p/*TP53* (FISH) в обеих группах достоверно не различалась, $p = 0,454$ и $p = 0,685$ соответственно.

Используя методику NGS у 25 пациентов всего был выявлен 631 вариант нуклеотидной последовательности, среди которых отмечалось 128 мутаций, имеющих клиническое значение. Медиана количества значимых мутаций на 1 ген составила 2,7 (95% ДИ: 1,9-3,4). Наибольшая частота мутаций отмечалась в генах: *KMT2C* – 52%, *KMT2D* – 48%, *CREBBP* – 32%, *NOTCH2* – 32%, *GNAS* – 24%, *FAT1*, *ITPKB* и *KDR* – по 20%, рисунок 3.

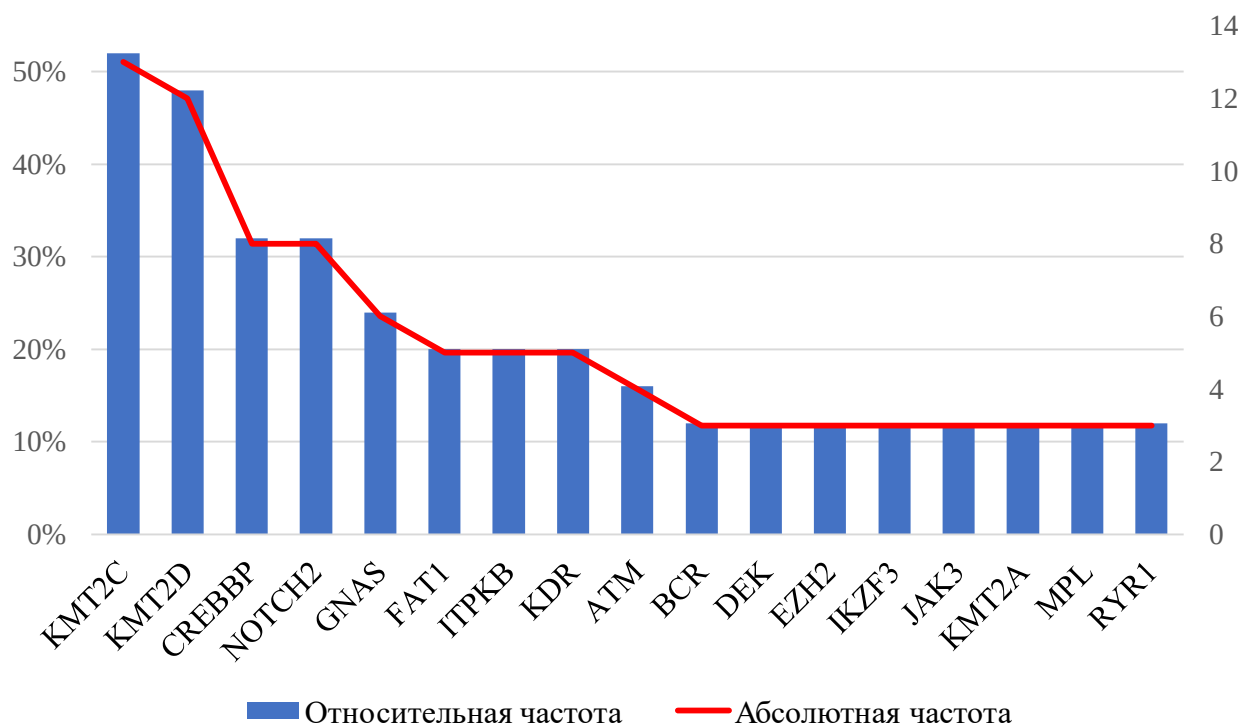


Рисунок 3. Гистограмма относительных и абсолютных частот мутаций генов у пациентов с фолликулярной лимфомой по данным NGS

Миссенс-мутации встречались с частотой 83,6%, нонсенс – 5,5%, синонимичные – 4,7%, мутации со сдвигом рамки считывания – 4,9%, другие – 2,3%. Медиана VAF составила 8,96% (25 и 75 процентиля: 3,83-36,77).

Изменения гена *EZH2* (n = 14) были выявлены у 7 пациентов, медиана VAF равнялась 7,90% (25 и 75 процентиля: 3,82-39,53), таблица 2. Среди них суммарное количество патогенных и вероятно патогенных вариантов составило 3 (12%). Как и в соответствии с результатами секвенирования по Сэнгеру все клинически значимые изменения в гене *EZH2* отмечались в 16 экзоне в положении 646.

Таблица 2

Изменения гена *EZH2* у 25 пациентов с фолликулярной лимфомой (FL) с указанием клинической значимости

№	Пациент	Позиция hg19	кДНК	Белок	VAF	rsID (dbSNP)	Клин. значимость
1	FL005	chr7:148543693TA>T	c.118-4delT		64,73 %	rs3214332	Д
2		chr7:148506396A>C	c.2110+6T>G		3,97 %	rs41277434	Д
3		chr7:148508727T>A	c.1937A>T	p.Y646F	5,58 %	rs267601394	П
4		chr7:148526908A>G	c.396T>C	p.P132P	3,88 %	rs61732845	ВД
5	FL011	chr7:148526908A>G	c.396T>C	p.P132P	55,29 %	rs61732845	ВД
6	FL012	chr7:148508728A>T	c.1936T>A	p.Y646N	13,56 %		ВП
7	FL034	chr7:148543693TA>T	c.118-4delT		78,57 %	rs3214332	Д
8		chr7:148506396A>C	c.2110+6T>G		3,83 %	rs41277434	Д
9		chr7:148525904C>G	c.553G>C	p.D185H	2,51 %	rs2302427	Д
10		chr7:148526908A>G	c.396T>C	p.P132P	4,35 %	rs61732845	ВД
11	FL048	chr7:148526908A>G	c.396T>C	p.P132P	40,76 %	rs61732845	ВД
12		chr7:148543693TA>T	c.118-4delT		93,33 %	rs3214332	Д
13	FL072	chr7:148506396A>C	c.2110+6T>G		50,15 %	rs41277434	Д
14	FL163	chr7:148508727T>G	c.1937A>C	p.Y646S	8,30 %	rs267601394	ВП

Примечание: ВД – вероятно доброкачественная, ВП – вероятно патогенная, Д – доброкачественная, П – патогенная, НО – неопределенного значения. Серым цветом выделены мутации, имеющие клиническое значение

Сокращения: кДНК – комплементарная ДНК, VAF (Variant allele frequency) – частота встречаемости аллеля, rsID (Reference SNP cluster ID) – идентификатор эталонного кластера SNP (однонуклеотидного полиморфизма), dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism Database) – база данных однонуклеотидных полиморфизмов

Мутации гена *EZH2* ассоциированы с мутациями в гене *CREBBP* ($r = 0,542$, $p = 0,004$), *KDR* ($r = 0,435$, $p = 0,026$) и *KMT2D* ($r = 0,422$, $p = 0,032$). Также отмечается статистически значимая корреляция между генами *CREBBP* и *KMT2D*, равная $0,441$, $p = 0,024$. Указанные ассоциации обусловлены тем, что гены *EZH2*, *CREBBP* и *KMT2D* в функциональном плане относятся к группе генов, изменяющих модификацию гистонов и участвующих в регуляции транскрипции генов-мишеней.

Несмотря на то, что частоты мутаций гена *EZH2* различались в зависимости от используемого метода диагностики (12% против 17%), данные изменения были статистически недостоверны, $p = 0,532$. У всех пациентов (FL005, FL012 и FL163) с выявленными мутациями гена *EZH2* согласно результатам NGS, отмечались аналогичные изменения в соответствии с данными секвенирования по Сэнгеру. Таким образом, расхождение полученных частот, вероятно, обусловлено малым объемом выборки в анализе NGS и несоответствием количества пациентов при обоих методах диагностики (25 против 111). Частота мутаций гена *EZH2* в нашем исследовании составила 12-17%, что соответствует данным как международных исследований [2, 3, 9, 11], так и результатам недавно опубликованного отечественного исследования [18], в котором частота мутаций гена *EZH2* у пациентов с ФЛ 1-3А цитологического типа равнялась 13%. Авторы проводили оценку полиморфизма гена *EZH2* и установили, что генотип GG полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* является значимым благоприятным прогностическим фактором.

Типичной для ФЛ транслокации t(14;18) недостаточно для развития неконтролируемого лимфомагенеза, в то время как мутации гена *EZH2* усиливают пролиферативный потенциал В-клеток предопухолевого клона. Новая мишень терапии злокачественных новообразований – молекула белка EZH2 стала очередным направлением в биомедицинских исследованиях. В связи с этим многие новые таргетные препараты находятся в стадии разработки и оценки в клинических исследованиях и только таземетостат был одобрен для лечения рефрактерной и/или рецидивирующей ФЛ. Комбинированное применение лекарственных средств, воздействующих на эпигеном, с другими имеющимися лекарственными препаратами, возможно, станет новой парадигмой в терапии злокачественных новообразований и ФЛ, в частности.

Таким образом, мы установили частоту встречаемости мутаций гена *EZH2* и

продемонстрировали их связь с клинико-лабораторными и молекулярно-генетическими параметрами ФЛ.

Выводы

1. Частота мутаций гена *EZH2*, определяемая с помощью секвенирования по Сэнгеру и NGS, в российской когорте пациентов составляет 12-17%, что согласуется с ранее опубликованными исследованиями.

2. Мутации гена *EZH2* чаще встречаются у пациентов с 1-2 цитологическим типом и ассоциированы с мутациями в генах *CREBBP*, *KMT2D* и *KDR*. Всё вышеизложенное позволяет считать мутации гена *EZH2* возможным предиктором течения заболевания и одной из основных мишеней терапевтического воздействия при ФЛ.

Библиография

1. Margueron R., Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469(7330):343–349. DOI: 10.1038/nature09784.
2. Bodor C., Grossmann V., Popov N., et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood*. 2013;122(18):3165–3168. DOI: 10.1182/blood-2013-04-496893.
3. Béguelin W., Popovic R., Teater M., et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*. 2013;23(5): 677–692. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.011.
4. Caganova M., Carrisi C., Varano G., et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5009–5022. DOI: 10.1172/JCI70626.
5. Wang X., Brea L.T., Yu J. Immune modulatory functions of EZH2 in the tumor microenvironment: implications in cancer immunotherapy. *Am J Clin Exp Urol*. 2019;7(2):85–91.
6. Simon J.A., Lange C.A. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*. 2008;647(1-2):21–29. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010.
7. Green M.R. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. *Blood*. 2018;131(6):595-604. DOI: 10.1182/blood-2017-08-737361.
8. Beguelin W., Rivas M.A., Fernandez MTC. et al. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat Commun*. 2017; 8(1):877. DOI: 10.1038/s41467-017-01029-x.
9. Nagy A., Batai B., Balogh A. et al. Quantitative Analysis and Monitoring of EZH2 Mutations Using Liquid Biopsy in Follicular Lymphoma. *Genes (Basel)*. 2020;11(7):785. DOI: 10.3390/genes11070785.

10. Sneeringer C.J., Scott M.P., Kuntz K.W. et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(49):20980–20985. DOI: 10.1073/pnas.1012525107.
11. Yap D.B., Chu J., Berg T. et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011;117(8):2451–2459. DOI: 10.1182/blood-2010-11-321208.
12. Pastore A., Jurinovic V., Kridel R. et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol*. 2015;16(9):1111–1122. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00169-2.
13. Lockmer S., Ren W., Brodtkorb M., et al. M7-FLIPI is not prognostic in follicular lymphoma patients with first-line rituximab chemo-free therapy. *Br J Haematol*. 2020;188(2):259–267. DOI: 10.1111/bjh.16159.
14. Huet S., Xerri L., Tesson B., et al. EZH2 alterations in follicular lymphoma: biological and clinical correlations. *Blood Cancer J*. 2017;7(4):e555. DOI: 10.1038/bcj.2017.32.
15. Stazi G., Zwergel C., Mai A., Valente S. EZH2 inhibitors: a patent review (2014–2016). *Expert Opin Ther Pat*. 2017;27(7):797–813.
16. Morschhauser F., Tilly H., Chaidos A., et al. Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(11):1433–1442. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30441-1.
17. Izutsu K., Ando K., Nishikori M. et al. Phase II study of tazemetostat for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma with EZH2 mutation in Japan. *Cancer Sci*. 2021;112(9):3627. DOI: 10.1111/CAS.15040.
18. Нестерова Е.С., Северина Н.А., Бидерман Б.В. и др. Определение соматических мутаций в гене EZH2 и оценка их прогностической значимости при фолликулярной лимфоме 1–3А цитологического типа. *Клиническая онкогематология*. 2023; 16(1):80–87.