

Zmiany genetyczne w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B

Article history:
Received: 30.10.2019
Accepted: 12.11.2019

Genetic alterations in diffuse large B cell lymphoma

Agnieszka Karczmarczyk^{1*},
Krzysztof Giannopoulos^{1,2}

¹Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin, Polska
²Oddział Hematologii Centrum Onkologii Ziemi
Lubelskiej im. św. Jana z Dukli, Lublin, Polska

Streszczenie

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL) jest najczęstszym rodzajem chłoniaka u dorosłych i stanowi 30-40% wszystkich chłoniaków niehodgkinowskich. Większość pacjentów z DLBCL może być wyleczona za pomocą standardowego schematu immunochemioterapii zawierającego rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicynę, winkrystynę i prednizon (R-CHOP), jednak 30-40% pacjentów ma nawrót choroby lub jest opornych na leczenie pierwszego rzutu. Zrozumienie patogenez DLBCL jest więc niezbędne do zidentyfikowania nowych potencjalnych celów terapeutycznych i opracowania nowych schematów leczenia w walce z tą chorobą. W przedstawionej pracy podsumowujemy obecną literaturę, skupiając się na zmianach genetycznych, w tym mutacjach somatycznych, zmianach liczby kopii i translokacjach chromosomowych zidentyfikowanych w DLBCL.

Abstract

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma in adults and accounts for 30-40 % of all non-Hodgkin lymphomas. Most patients with DLBCL can be cured by using standard immunochemotherapy regimen rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (R-CHOP), however, 30-40% of patients have disease relapse or are refractory to first-line treatment. Understanding the DLBCL pathogenesis is essential to identify potential therapeutic targets and development of new treatment regimens to tackle this disease. In this review, we summarize the current literature focusing on the genetic lesions, including somatic mutations, copy number alterations, and chromosomal translocations identified in DLBCL.

© 2019 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Insitute of Hematology and Transfusion Medicine. Published by Sciendo. All rights reserved.

Słowa kluczowe:

chłoniak rozlany z dużych komórek B, zmiany genetyczne, nowe molekularne klasyfikacje

Keywords:

diffuse large B cell lymphoma, genetic alterations, novel molecular classifications

WSTĘP

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL) jest najczęstszym rodzajem chłoniaka na świecie, stanowiącym 30-40% chłoniaków niehodgkinowskich (*non-Hodgkin lymphomas* – NHLs) oraz charakteryzującym się agresywnym przebiegiem klinicznym. Ponad połowa pacjentów, mimo zaawansowania choroby, może zostać wyleczona za pomocą standardowego schematu immunochemioterapii zawierającego rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicynę, winkrystynę i prednizon (*rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone* – R-CHOP). Natomiast pozostali chorzy, którzy są oporni na leczenie pierwszego rzutu lub występuje u nich nawrót choroby po całkowitej remisji, mają rokowanie niekorzystne i wymagają nowatorskiego podejścia terapeutycznego. Zrozumienie patogenez DLBCL jest więc niezbędne do zidentyfikowania potencjalnych celów terapeutycznych i opracowania nowych schematów leczenia w walce z tą chorobą [1]. Ostatnie postępy w dziedzinie biologii molekularnej pozwoliły na lepsze zdefiniowanie tej heterogennej grupy chłoniaków, co może przyczynić się do indywidualizacji leczenia oraz poprawy rokowania chorych. Na podstawie profilu ekspresji genów (*gene expression profile* – GEP)

wg klasyfikacji Cell of Origin (COO) zidentyfikowano dwa podtypy molekularne DLBCL zależne od komórek, z których się wywodzą. Na tej podstawie wyróżniono podtyp DLBCL wywodzący się z komórek B ośrodków rozmnażania (*germinal center B-cell* – GCB) oraz podtyp wywodzący się z postgerminalnych, aktywowanych limfocytów B (*activated B-cell* – ABC). Podtypy te mają odrębne charakterystyczne zmiany genetyczne. Chłoniaki typu GCB charakteryzuje typowa dla prawidłowych limfocytów B ekspresja genów centrów rozmnażania (*germinal center* – GC) grudki chłonnej oraz ekspresja genów związanych z proliferacją i metabolizmem komórek. Z kolei podtyp ABC charakteryzuje się zahamowaniem ekspresji białek uczestniczących w tworzeniu ośrodków rozmnażania oraz nadekspresją genów i białek zaangażowanych w różnicowanie limfocytów B w komórki plazmatyczne. Obecny podział DLBCL oparty na wynikach profilowania ekspresji genów według wyników większości badań poprawił stratyfikację ryzyka pacjentów z DLBCL i dostarczył informacji zarówno o mechanizmach molekularnych, jak i celach terapeutycznych. Niemniej jednak, zgodnie z obecnym systemem klasyfikacji 10-20% DLBCL pozostaje niesklasyfikowanych i w tych przypadkach nie jest możliwe jednoznaczne przypisanie do podtypu [1, 2]. Ostatnio dwie grupy badaczy przeprowadziły niezależnie badania, w których przy

* Corresponding author: Agnieszka Karczmarczyk, Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, Polska; tel. 81 448 66 37, fax 81 448 66 34, e-mail: agnieszka.piechnik@umlub.pl

wykorzystaniu różnych metod bioinformatycznych i statystycznych udało się opracować nowe, genetycznie zdefiniowane grupy DLBCL. Na podstawie uzyskanych danych autorzy zaproponowali nową klasyfikację molekularną DLBCL [3, 4].

W przedstawionej pracy dokonujemy przeglądu częstości występowania oraz funkcji określonych zdarzeń genetycznych, w tym mutacji somatycznych, zmian liczby kopii i translokacji chromosomowych w DLBCL.

RÓŻNICOWANIE LIMFOCYTÓW B

Deregulacja aktywności BCL6

BCL6 (*B-cell lymphoma 6*) jest represorem transkrypcji należącym do rodziny czynników transkrypcyjnych charakteryzujących się obecnością domeny BTB oraz domeny zawierającej palce cynkowe [5, 6]. W dojrzałych limfocytach B, BCL6 ulega ekspresji wyłącznie w centrum germinacyjnym, gdzie reguluje wiele procesów biologicznych obejmujących [7, 8]: i) zatrzymanie cyklu komórkowego przez represję genów białek p21 (*CDKN1A*) i p27 (*CDKN1B*), co powoduje promowanie proliferacji [9]; ii) blokowanie ekspresji wielu czynników zaangażowanych w detekcję uszkodzeń i naprawę DNA, w tym białko p53 (*tumor protein p53* – TP53), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), CHEK1 (*checkpoint kinase 1*) [10, 11, 12]; iii) zahamowanie procesów antyapoptotycznych przez represję genu *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) [13]; iv) zahamowanie końcowego różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne przez represję genu *PRDM1* (*PR domain containing 1 with zinc finger domain*) [14, 15]. Procesy te są przywracane, gdy następuje zahamowanie ekspresji BCL6, co jest niezbędne do zakończenia reakcji germinacyjnej i dalszego różnicowania limfocytów w komórki pamięci lub plazmocyty.

Zmiany genetyczne obejmują wiele cząsteczek, które mogą prowadzić do rozregulowania aktywności BCL6 w DLBCL. W 19-45% przypadków DLBCL dochodzi do translokacji chromosomowej locus *BCL6* (3q27) poprzez umieszczenie regionu kodującego genu w obręb heterologicznych sekwencji promotorowych, najczęściej do loci genów kodujących łańcuchy ciężkie immunoglobulin (*immunoglobulin light chain* – IGH) – t(3;14)(q27;q32), a rzadziej do loci genów kodujących łańcuchy lekkie immunoglobulin (*immunoglobulin heavy light* – IGL) – t(3;22)(q27;q11) lub t(2;3)(p12;q27). W wyniku tego zaburzenia dochodzi do ciągłej ekspresji i aktywności BCL6 w limfocytach B, a tym samym tolerancji na uszkodzenie DNA i zablokowanie końcowego różnicowania [16, 17]. Translokacje *BCL6* występują częściej w podtypie ABC DLBCL (24-57%) niż w GCB DLBCL (10-31%). Innym mechanizmem deregulacji *BCL6* są hipermutacje somatyczne w regionach odpowiadających za autoregulację genu *BCL6*, które głównie występują w około 10% przypadków DLBCL typu GCB, powodujące utratę zdolności do samoregulacji, a tym samym nadekspresję BCL6 [18, 19].

Oprócz zmian, które bezpośrednio obejmują locus *BCL6*, zaobserwowano występowanie kilku innych zmian genetycznych, które wpływają w sposób pośredni na regulację ekspresji BCL6. Mutacje w genie *MEF2B* (*myocyte enhancer factor 2B*), które mogą występować zarówno w podtypie GCB (11-15%), jak i ABC (4-10%) prowadzą do zwiększenia poziomów aktywności transkrypcyjnej,

zwiększając tym samym transkrypcję *BCL6* [3, 20]. Dodatkowo wykazano, że FBXO11 (*F-box protein 11*), który pośredniczy w ubikwitylacji i degradacji BCL6, jest inaktywowany przez mutacje punktowe lub małe insercje (2-4%) oraz delecje (2-9%) w DLBCL. Inaktywacja FBXO11 zwiększa ekspresję BCL6 poprzez zmniejszenie szybkości degradacji, a tym samym zwiększa jego stabilność [3, 21]. Ponadto mutacje wpływające na CREBBP (*CREB binding protein*) oraz EP300 (*E1A binding protein p300*) zapobiegają acetylacji BCL6, co powoduje zwiększenie jego aktywności jako represora transkrypcji [22].

Inaktywacja PRDM1

PRDM1, zwany także *BLIMP1* (*B lymphocyte induced maturation protein 1*), jest genem kodującym represor transkrypcji, niezbędnym w końcowej fazie różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne. Mutacje w genie *PRDM1* występują tylko w podtypie ABC DLBCL, w 20-24% przypadków są to zmiany powodujące skrócenie genu oraz delecje homozygotyczne występujące w 3-6% przypadków [3, 23]. Ponadto zaobserwowano mutacje typu zmiany sensu, które mogą prowadzić do zmniejszenia stabilności i/lub funkcji transkrypcyjnej *PRDM1* u niektórych pacjentów [24]. Komórki ze zmutowanym genem *BLIMP1* charakteryzują się brakiem zdolności do zatrzymania cyklu komórkowego i różnicowania w plazmocyty [23, 25]. W badaniach *in vivo* wykazano, że delecja genu *BLIMP1* u myszy prowadzi do rozwoju DLBCL fenotypowo podobnego do podtypu ABC i współwystępuje z konstytutywną aktywacją szlaku jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (*nuclear factor kappa B* – NF-κB), powodując przyśpieszenie limfomagenezy [23, 24].

SYGNALIZACJA BCR I POWIĄZANE ŚCIEŻKI SYGNAŁOWE

Mutacje w szlaku sygnałowym BCR

Sygnal za pośrednictwem receptora B komórkowego (*B-cell receptor* – BCR) jest kluczowy dla przeżycia, rozwoju i różnicowania limfocytów B. W podtypie ABC DLBCL wykazano przewlekłe aktywną postać przekazywania sygnału za pośrednictwem receptora BCR, która jest podtrzymywana przez zmiany genetyczne mające wpływ na elementy tego szlaku sygnałowego. CD79A i CD79B tworzą heterodimer i stanowią ważną część kompleksu sygnałowego BCR. Sygnal z receptora BCR prowadzi do fosforylacji przez kinazy z rodziny SRC (Lyn, Fyn, Blk) immunoreceptorowego motywu aktywowującego opartego o resztę tyrozyny (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif* – ITAM) w obrębie cytoplazmatycznej części heterodimeru CD79A/CD79B i przyłączenia kinazy tyrozynowej Syk. W wyniku pobudzenia receptora BCR dochodzi w konsekwencji do aktywacji szlaków sygnałowych: NFκB, kinazy 3-fosfatydilinozytolu (*phosphatidylinositol 3-kinase* – PI3K), kinazy aktywowanej miogenami (*mitogen-activated protein kinase* – MAPK), jądrowego czynnika aktywowanych limfocytów T (*nuclear factor of activated T-cells* – NFAT) uczestniczących w procesach promujących proliferację i przeżycie zarówno prawidłowych, jak i patologicznych limfocytów B [26]. Mutacje motywów ITAM *CD79B* zaobserwowano w około 20% przypadków ABC DLBCL i tylko u 3% chorych z podtypem GCB DLBCL. Natomiast mutacje ITAM *CD79A* są

rzadsze i występują w ~ 3% przypadków ABC DLBCL. Większość mutacji w genie *CD79B* dotyczy pierwszej tyrozyny motywu ITAM, powodując wzrost ekspresji BCR na powierzchni komórki oraz osłabienie aktywności kinazy Lyn, która w warunkach prawidłowych hamuje aktywność BCR poprzez ujemne sprzężenie zwrotne [26]. Ponadto w warunkach fizjologicznych, efektem pobudzenia receptora BCR jest aktywacja kinazy Brutona (*Bruton's tyrosine kinase* – BTK), która prowadzi do aktywacji kinazy PKC β (*protein kinase C β*). Aktywowana PKC β pobudza kompleks białkowy CBM zbudowany z: CARD11 (*caspase recruitment domain-containing protein 11*), BCL10 oraz MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1*) [26]. Kompleks ten jest odpowiedzialny za aktywację szlaku NF- κ B. Mutacje w genie *CARD11* występują zarówno w podtypie ABC (7-18%), jak i GCB (4-17%) DLBCL i dotyczą głównie domeny CC (*coiled-coil*) CARD11, powodując spontaniczne tworzenie się agregatów, które rekrutują wszystkie elementy niezbędne do aktywacji NF- κ B [3, 27]. W ~ 25% przypadków DLBCL typu GCB i 11% typu ABC wykazano występowanie translokacji *BCL10*, które mogą przyczynić się do nadekspresji BCL10 [28]. Natomiast amplifikację genu *BCL10* zaobserwowano w obu podtypach DLBCL (2%). Wykazano również występowanie mutacji w *BCL10* zarówno w podtypie ABC (10%), jak i GCB (6%) DLBCL [3]. Mutacje w tym genie są głównie zlokalizowane w domenie karboksylowej, a większość z nich powoduje skrócenie białka BCL10. Skrócone białko traci aktywność proapoptyczną, ale nadal może aktywować szlak NF- κ B, co może wyjaśniać patogenną rolę tego białka w DLBCL [29]. Zaobserwowano także amplifikacje genu *MALT1* w 7% przypadków ABC DLBCL oraz rzadziej w GCB DLBCL (1%) [3].

Mutacje w genie *MYD88*

W warunkach fizjologicznych mieloidalny czynnik różnicowania 88 (*myeloid differentiation factor 88* – MYD88) jest białkiem przekaźnikowym odpowiedzialnym za aktywację szlaku NF- κ B po stymulacji receptorów Toll-podobnych (*Toll-like receptor* – TLR) i receptorów dla IL-1 i IL-18. Zmiany w genie *Myd88* występują w około 40% ABC DLBCL i w 8-14% w podtypie GCB DLBCL [3, 30]. Mutacja punktowa prowadząca do substytucji w pozycji L265P w hydrofobowym rdzeniu domeny TIR (*Toll/IL-1 receptor*) białka MYD88 występuje wyłącznie w podtypie ABC DLBCL (~ 30%) [31]. Mutacja MYD88L265P powoduje spontaniczne składanie kompleksu białkowego zawierającego kinazę 1 związaną z receptorem interleukiny 1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1* – IRAK1) i kinazę 4 związaną z receptorem interleukiny 1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4* – IRAK4), co skutkuje zwiększoną aktywnością kinazy IRAK4 i fosforylacją IRAK1. Hiperfosforylowany IRAK1 prowadzi do aktywacji szlaku NF- κ B, aktywacji kinazy Janusa (*Janus-activated kinase* – JAK) przez białko przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję 3 (*signal transducer and activator of transcription 3* – STAT3) oraz wydzielania IL-6, IL-10 i interferonu β (*interferon β* – INF- β), co promuje przeżycie komórek [30]. W części przypadków mutacje MYD88L265P mogą współwystępować z innymi mutacjami stwierdzanymi w DLBCL ABC, głównie dotyczącymi genów *CD79A/B*, *CARD11* i *TNFAIP3* (*TNF alpha-induced protein 3*). Zaobserwowano, że mutacje w genie *CD79A* lub *CD79B* częściej

występują w przypadkach DLBCL, w których stwierdzono obecność mutacji L265P w genie *Myd88* (34% przypadków) niż w tych bez tej zmiany (18% przypadków), co może sugerować, że zmiany te współdziałają w rozwoju podtypu ABC DLBCL [30, 32]. Badania na myszach wykazały, że występowanie mutacji w genie *CD79B* jak i mutacji MYD88L265P umożliwia rozwój samoreaktywnych limfocytów B [33].

Mutacje w genie *TNFAIP3*

Gen *TNFAIP3* znajduje się na chromosomie 6 i koduje białko A20 odpowiedzialne za hamowanie aktywacji NF- κ B w wyniku stymulacji receptorów TLR i BCR. W prawie 30% przypadków ABC DLBCL wykazano występowanie mutacji i/lub delecji dezaktywujących gen *TNFAIP3*. Inaktywacja TNFAIP3/A20 może zatem przyczynić się do limfomagenezy przez indukowanie niewłaściwie przedłużonej aktywacji szlaku NF- κ B. W badaniach przeprowadzonych na liniach komórkowych DLBCL wykazano, że reekspresja funkcjonalna TNFAIP3/A20 prowadzi do cytoplazmatycznej relokalizacji NF- κ B i apoptozy, co potwierdza rolę tego genu jako genu supresorowego [34, 35, 36].

Amplifikacja *REL*

Protoonkogen REL jest członkiem rodziny NF- κ B, który aktywuje docelowe geny przez tworzenie homodimerów lub heterodimerów z innymi członkami rodziny NF- κ B, w tym p65 i p50 [37]. Amplifikacja genu *REL* występuje głównie w podtypie GCB DLBCL (~ 7%) i jest związana z podwyższonym poziomem mRNA *REL*. Zwiększona ekspresja REL może promować limfomagenezę przez zwiększenie poziomu aktywacji NF- κ B [38].

Szlak sygnałowy *PI3K–AKT–mTOR*

Aktywowana kinaza PI3K powoduje aktywację serynowo-treoninowej kinazy AKT, prowadząc do aktywacji kinazy białkowej treoninowo-serynowej mTOR (*mammalian target of rapamycin*) i innych szlaków sygnałowych, które promują przeżycie komórek. Amplifikację i mutację genu katalitycznej podjednostki PI3K (*PI3KCA*) zidentyfikowano w ~ 6% ABC DLBCL. Inhibitorem szlaku kinazy mTOR jest białko kodowane przez gen supresorowy kodujący homolog fosfatazy i tensyny (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* – PTEN). Delecję w genie *PTEN* wykazano u 9-11% chorych na DLBCL, zarówno typu GCB, jak i ABC. Inaktywacja genu *PTEN* powoduje hiperaktywację szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR i tym samym stymuluje proliferację komórek [3, 4, 39, 40]. *MIR17HG*, który koduje mikroRNA ukierunkowane na mRNA PTEN, jest amplifikowany głównie w DLBCL GCB (~ 8%). Amplifikacja *MIR17HG* prowadzi do obniżonej ekspresji PTEN i promuje sygnalizację mTOR [3].

ZMIANY W SZLAKU SYGNAŁOWYM NOTCH

Mutacje w genie *NOTCH1* występują w około 6% przypadków DLBCL typu ABC, a mutacje w *NOTCH2* głównie obserwowane są w niesklasyfikowanym DLBCL (~ 21%). Mutacje w genie *NOTCH1* i *NOTCH2* powodują utratę domeny PEST, co skutkuje wzrostem

stabilności tego białka. Inhibitor szlaku NOTCH, *SPEN* ulega mutacji w około 11% przypadków DLBCL, częściej w niesklasyfikowanym DLBCL (~ 18%). Utrata funkcji hamującej przez białko *SPEN* prowadzi do aktywacji szlaku NOTCH i prawdopodobnie przyczynia się do patogenezy DLBCL [3, 41].

ZABURZENIA W REGULACJI EPIGENETYCZNEJ

Mutacje w genie *EZH2*

Gen *EZH2* koduje metylotransferazę histonową *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*), która zawiera domenę SET katalizującą trimetylację lizyny w pozycji 27 histonu H3 (H3K27me3), co prowadzi do represji transkrypcji. Białko *EZH2* należy do kompleksu represyjnego Polycomb-2 (*polycomb repressive complex-2* – PRC2) i jest niezbędne w tworzeniu centrów rozmnażania, gdzie kontroluje ekspresję wielu genów, zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego (*CDKN1A*) i końcowe różnicowanie komórek centrów rozmnażania (*IRF4*, *PRDM1*) [42, 43]. Około 20% przypadków DLBCL typu GCB wykazuje heterozygotyczne mutacje w genie *EZH2*, skutkiem których jest zastąpienie tyrozyny w pozycji Y641w domenie SET białka. Mutacja *EZH2*Y641 powoduje wzrost trimetylacji histonu H3K27, co powoduje zwiększoną aktywność PRC2 [3, 44]. Mutacja Y641 w genie *EZH2* powoduje zahamowanie ekspresji *CDKN1A* i *PRDM1*, co przyczynia się odpowiednio do hiperprolifracji limfocytów B ośrodka rozmnażania i zablokowania różnicowania w komórki plazmatyczne [42]. Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że ekspresja zmutowanego allelu *EZH2*Y641 prowadzi do hiperplazji centrów rozmnażania u myszy i w połączeniu z deregulacją *BCL2* do przyspieszenia nowotworzenia [43].

Mutacje inaktywujące metylotransferazę *KMT2D*

Gen *KMT2D* (zwany również *MLL2*) koduje białko należące do rodziny SET1 metylotransferaz histonowych, które indukuje

aktywną konformację chromatyny, głównie przez mono- i dimetylację lizyny w pozycji 4 histonu H3 (H3K4) [45]. W centrach rozmnażania limfocytów B *KMT2D* zajmuje domeny chromatyny we wzmacniaczach i miejsca w regionach promotorowych, należące do genów zaangażowanych w regulację apoptozy, w sygnalizację szlaku CD40 i BCR oraz w kontrolę migracji komórek [46]. Monoalleliczne i rzadziej bialleliczne mutacje somatyczne w genie *KMT2D* występują w 30% przypadków DLBCL. Mutacje inaktywujące w domenie C-końcowej SET *KMT2D* powodują utratę aktywności enzymatycznej tego białka [47, 48]. W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach posiadających delecję genu *Kmt2d* oraz deregulację *BCL2* wykazano rozwój nowotworów limfoidalnych, które wykazują fenotyp obserwowany u ludzi podczas transformacji chłoniaka grudkowego (*follicular lymphoma* – FL) do DLBCL, co potwierdza jego rolę jako genu supresorowego [46, 49].

Mutacje inaktywujące acetylotransferazy *CREBBP* i *EP300*

Około 30% przypadków DLBCL ze znaczną przewagą z podtypem GCB wykazuje mutacje somatyczne i/lub delecje genów kodujących acetylotransferazy histonowe należące do rodziny białek KAT3: *CREBBP* oraz *EP300*. Białka te są plejotropowymi regulatorami ekspresji genów, które katalizują dodawanie grup acetylowych do specyficznych reszt lizynowych w histonach i białkach niehistonowych. Zaburzenia dotyczące genu *CREBBP* występują w około 25% przypadków DLBCL, a mutacje w genie *EP300* są rzadsze i występują u około 5% chorych. Mutacje w genach *CREBBP* i *EP300* powodują zaburzenie funkcji tych białek przez usunięcie domeny acetylotransferazy histonowej (HAT) lub przez wprowadzenie zmian aminokwasów w tej domenie, co powoduje zmniejszenie powinowactwa do Acetylo-CoA [22, 50]. Mutacje genu *CREBBP* przyczyniają się do limfomagenezy w wyniku upośledzenia wielu procesów biologicznych, szczególnie poprzez antagonizowanie protoonkogennej aktywności *BCL6* przez podwójny mechanizm obejmujący: i) bezpośrednią acetylację białka *BCL6*, która zapobiega rekrutacji deacetylaz histonów

Tabela 1. Częstość występowania mutacji w genach zaangażowanych w patogenezę DLBCL [3, 4]
Table 1. Frequencies of gene mutations implicated in the DLBCL pathogenesis [3, 4]

Szlak sygnałowy / proces	Gen (częstość występowania mutacji)
BCR/NF-κB	<i>MYD88</i> (18-27%), <i>CD79B</i> (14-15%), <i>CARD11</i> (11-15%), <i>TNFAIP3</i> (9-18%), <i>TBL1XR1</i> (7-13%), <i>KLHL6</i> (9-10%), <i>NFKBIE</i> (3-8%), <i>ZC3H12A</i> (3-7%), <i>BCL10</i> (5%), <i>NFKBIA</i> (5%), <i>PRKCB</i> (4-5%), <i>PTPN6</i> (4-5%), <i>LYN</i> (3-4%), <i>TLR2</i> (3%)
Regulacja epigenetyczna	<i>KMT2D</i> (25-33%), <i>CREBBP</i> (17-18%), <i>HIST1H1E</i> (13-16%), <i>HIST1H1C</i> (12%), <i>EZH2</i> (7-9%), <i>HIST1H1B</i> (9%), <i>EP300</i> (8%), <i>HIST1H2BK</i> (4-8%), <i>HIST1H1D</i> (7%), <i>HIST1H2BC</i> (5-6%), <i>HIST1H2AC</i> (6%), <i>HIST1H2AM</i> (6%), <i>HIST1H2BE</i> (5%)
TP53 / naprawa uszkodzeń DNA	<i>TP53</i> (21-24%), <i>UBE2A</i> (4-8%), <i>ZNF423</i> (2%)
Regulacja immunologiczna	<i>HLAB</i> (12-22%), <i>B2M</i> (9-17%), <i>H2LA</i> (8-16%), <i>TNFRSF14</i> (14%), <i>CD58</i> (6-11%), <i>CD70</i> (9%), <i>HLAC</i> (4-7%), <i>CIITA</i> (3-6%), <i>CD274</i> (3%)
NOTCH	<i>DTX1</i> (12-15%), <i>SPEN</i> (9%), <i>NOTCH2</i> (7%)
Migracja i adhezja komórek	<i>GNA13</i> (8-11%), <i>RHOA</i> (5%), <i>GNA12</i> (3%), <i>CXCR4</i> (3%)
Apoptoza	<i>PIM1</i> (22-29%), <i>BCL2</i> (10-17%), <i>FAS</i> (8%)
Dojrzwienie i różnicowanie limfocytów B	<i>MEF2B</i> (7-12%), <i>IRF8</i> (11%), <i>BCL6</i> (6-11%), <i>PRDM1</i> (7-12%), <i>EBF1</i> (11%), <i>ZFP36L1</i> (8%), <i>POU2F2</i> (6%), <i>ETS1</i> (5%), <i>IKZF3</i> (3%), <i>BCL11A</i> (3%)
Cykl komórkowy	<i>BTG1</i> (14-16%), <i>CCND3</i> (5-11%)
PI3K-AKT-mTOR	<i>PTEN</i> (3-4%), <i>PI3KCA</i> (2%)
JAK-STAT	<i>STAT3</i> (6-10%), <i>STAT6</i> (5%), <i>IL6</i> (2%)

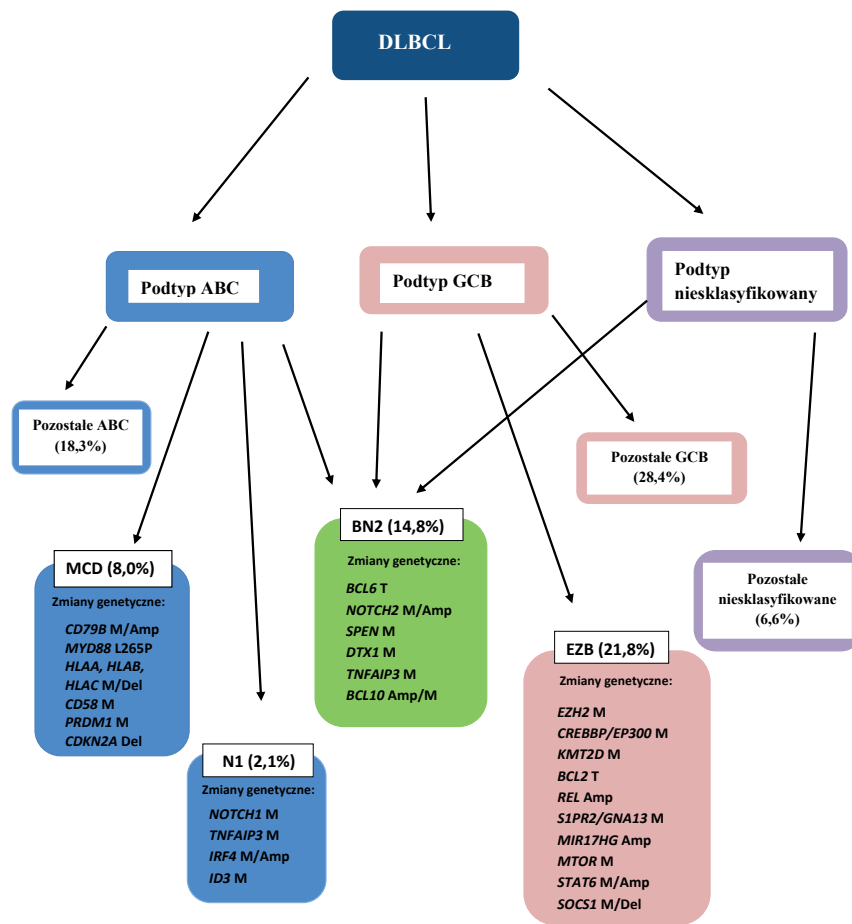
(histone deacetylases – HDACs), a zatem upośledza jego funkcje jako represora transkrypcji [22, 51]; ii) acetylację H3K27 w sekwencjach promotor/wzmacniacz genów docelowych BCL6, która przeciwdziała represyjnemu działaniu BCL6 przez ułatwienie transkrypcji [52, 53]. W dodatku mutacje inaktywujące CREBBP/EP300 mogą powodować zmniejszenie acetylacji białka supresorowego – p53, co skutkuje upośledzeniem jego funkcji. Ponadto CREBBP wiąże i acetyluje sekwencje regulatorowe kilku genów zaangażowanych w prezentację antygenów, w tym transaktywator CIITA i liczne loci kompleksu zgodności tkankowej klasy II (*major histocompatibility complex class II* – MHC-II), przyczyniając się w ten sposób do ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego [52, 53, 54].

APOPTOZA

BCL2

BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) jest onkogenem zlokalizowanym na chromosomie 18q21 kodującym antyapoptotyczne białko BCL2. Jego główną funkcją jest promowanie przeżycia komórki i zahamowanie białek proapoptotycznych, takich jak BAX (*Bcl-2-associated X protein*) i BAK (*Bcl-2 homologous antagonist*/

killer). Podczas prawidłowego rozwoju limfocytów B *BCL2* ulega represji przez *BCL6*, ułatwiając w ten sposób apoptozę komórek z niewłaściwym receptorem BCR. Następnie *BCL2* ulega reekspresji, a limfocyty B ulegają różnicowaniu w komórki plazmatyczne i komórki pamięci [13, 55]. W wyniku translokacji gen *BCL2* zostaje przeniesiony z chromosomu 18 na chromosom 14 do loci genów kodujących *IGH* – t(14;18)(q32;q21). Translokacja umieszczająca onkogen *BCL2* pod kontrolą silnego wzmacniacza transkrypcji genu immunoglobulinowego powoduje uaktywnienie transkrypcji tego genu, a w konsekwencji zahamowanie procesu apoptozy komórek. Rearanżacja genu *BCL2* występuje w 34-44% przypadków GCB DLBCL i związana jest z gorszym rokowaniem [56]. Wykazano również, że rearanżacje genu *BCL2* nie są jedynym mechanizmem prowadzącym do deregulacji ekspresji BCL2, nadekspresja tego białka może być związana z amplifikacją genu *BCL2* niezależnie od t(14;18)(q32;q21) i występuje głównie w podtypie ABC DLBCL (~ 14%) [57]. Mutacje somatyczne obejmujące promotor i regiony kodujące *BCL2* są wykrywane w około 35% DLBCL i znacznie częściej występują w podtypie GCB. Zmiany wpływające na region promotora *BCL2* zakłócają wiązanie BCL6 i tym samym upośledzają indukowaną przez BCL6 represję transkrypcji *BCL2*, co skutkuje zwiększoną ekspresją BCL2 [13, 58].



Ryc. 1. Podtypy genetyczne DLBCL zaproponowane przez Schmitz i wsp. [3]

Amp – amplifikacja, Del – delecja, M – mutacja, T – translokacja

Fig. 1. Genetic subgroups of DLBCL proposed by Schmitz et al. [3]

Amp – amplification, Del – deletion, M – mutation, T – translocation

ZMIANY WPLYWAJĄCE NA MIGRACJE I ADHEZJE LIMFOCYTÓW B

W warunkach fizjologicznych limfocyty B ośrodka rozmnażania nie przechodzą do krążenia i nie mogą przeżyć poza centrum rozrodczym. Proces ten jest kontrolowany przez aktywność dwóch specyficznych dla ośrodków rozmnażania receptorów sprzężonych z białkami G (*G-protein-coupled receptors* – GPCRs): receptor dla sfingozyno-1-fosforanu (*sphingosine-1-phosphate receptor* 2 – S1PR2) i purynergiczny receptor P2Y8 (*purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8* – P2RY8). W odpowiedzi na ligandy lipidowe receptory te rekrutują dwa blisko spokrewnione białka G (Gα12 i Gα13) i stymulują aktywność Rho poprzez specyficzne czynniki wymiany nukleotydów guanylowych (*guanine nucleotide exchange factors* – GEFs), aby ostatecznie zahamować sygnalizację AKT i migrację komórek. W około 20% przypadków GCB DLBC zidentyfikowano mutacje inaktywujące w kilku składnikach tego szlaku, głównie w genach *S1PR2*, *GNA13*, a rzadziej w *ARHGEF1* i *P2RY8*. Zmiany te są rzadko wykrywane w podtypie ABC DLBCL. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że delekcja tych genów jest związana z zaburzeniem architektury centrów rozmnażania, a następnie przechodzeniem limfocytów B do krwi obwodowej i szpiku kostnego, prowadząc ostatecznie do rozwoju GCB DLBCL [59, 60, 61]. Ponadto mutacje w genie *GNA13* i translokacje *BCL2* często współwystępują w GCB DLBCL1, co sugeruje, że te nieprawidłowości mogą współdziałać w promowaniu rozwoju GCB DLBCL. Niedobory Gα13 sprzyjają rozprzestrzenianiu się limfocytów B w ośrodku rozrodczym, a nadekspresja *BCL2* zapewnia przeżycie tych komórek poza centrum rozrodczym, przyczyniając się w ten sposób do limfomagenezy [59].

ABERRACJE GENU MYC

Gen *MYC* (*v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) znajduje się na chromosomie 8q24 i koduje białko należące do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających motyw suwaka leucynowego. Białko MYC kontroluje wiele funkcji biologicznych, w tym proliferację, wzrost komórek, metabolizm energetyczny, różnicowanie, apoptozę oraz replikację DNA, niezależnie od jego aktywności transkrypcyjnej [62, 63]. W prawidłowych limfocytach B, transkrypcja MYC jest hamowana przez *BCL6* [64]. Zwiększona ekspresja białka MYC może wystąpić w wyniku działania wielu mechanizmów, w tym translokacji chromosomowych, amplifikacji genu *MYC*, mutacji w obrębie genu i zmian liczby kopii. W 10-14% przypadków DLBCL typu GCB MYC ulega nieprawidłowej i konstytutywnej ekspresji jako wynik translokacji do loci genów kodujących *IGH* – t(8;14)(q24;q32) lub do loci genów kodujących *IGL* – t(2;8)(p12;q24) lub t(8;22)(q24;q11). Efektem translokacji jest nadekspresja genu, która z kolei skutkuje niekontrolowanym wzrostem i proliferacją komórek chłoniaka oraz wiąże się z gorszym rokowaniem [65, 66]. Może również prowadzić do represji apoptozy przez zwiększenie ekspresji genu supresorowego *TP53* [67].

U około 5-10% pacjentów z DLBCL stwierdza się występowanie rearanżacji onkogenu MYC ze złożonym kariotypem. Najczęstszą cytogenetyczną nieprawidłowością towarzyszącą MYC jest t(14;18)

dotycząca *BCL2* i rzadziej rearanżacje *BCL6* lub bardzo rzadko rearanżacje dotyczące genów *BCL3* (*B-cell lymphoma 3*) lub *CCND1*. Chłoniaki zawierające rearanżacje *BCL2* i/lub *BCL6* wraz z nieprawidłowościami *MYC* nazywane są odpowiednio *double-/triple-hit lymphoma* (DHL/THL) [68]. Około 65% pacjentów DHL wykazuje translokacje *MYC/BCL2*, u 14% stwierdza się translokacje *MYC/BCL6*, a pozostałe 21% pacjentów ma wszystkie 3 rearanżacje *MYC/BCL2/BCL6* (THL) [69]. Chłoniaki te zazwyczaj mają agresywny przebieg kliniczny charakteryzujący się zaawansowanym stadium choroby, umiejscowieniem pozawązłowym (szpik kostny i centralny układ nerwowy), wysokim poziomem dehydrogenazy mleczanowej w surowicy (*lactate dehydrogenase* – LDH) i pośrednim oraz wysokim ryzykiem według Międzynarodowego Indeksu Prognostycznego (*International Prognostic Index* – IPI) [69, 70, 71].

Zaobserwowano również występowanie przypadków DLBCL z współwystępowaniem zwiększonej ekspresji białka MYC i *BCL2*, która nie jest związana z translokacją chromosomową tych genów, lecz może być spowodowana przez amplifikację genu i procesy posttranslacyjne. Ten rodzaj chłoniaków jest określany jako *double expressor lymphoma* (DEL) i występuje znacznie częściej niż DHL (w około 25-35% wszystkich przypadków DLBCL). W testach immunohistochemicznych do określenia chłoniaków DEL wprowadzono wartość progową odsetka komórek dodatnich dla MYC definiowaną jako obecność barwienia MYC w ≥ 40% komórek nowotworowych i obecność barwienia *BCL2* w > 50% komórek nowotworowych. *BCL2* promuje przeżycie komórek i w połączeniu z ekspresją MYC zwiększa proliferację i przeżycie komórek chłoniaka, co może wyjaśniać biologiczne podstawy agresywnego przebiegu chłoniaków DEL [1, 72, 73]. W badaniach przeprowadzonych przez Hu i wsp. [73] zaobserwowano, że koekspresja *MYC/BCL2* w DLBCL jest związana z agresywnym przebiegiem klinicznym i częściej występuje w podtypie ABC DLBCL oraz przyczynia się do ogólnego gorszego rokowania u tych pacjentów. Ponadto, zwiększoną liczbę kopii *MYC* lub amplifikację genu stwierdzono w 8% do 20% przypadków DLBCL, ale wpływ tych zmian na rokowanie nie jest do końca wyjaśniony [74, 75]. U około 30% chorych z DLBCL wykazano występowanie mutacji w regionie kodującym (*coding DNA sequence* – CDS) oraz regionie mRNA niepodlegającym translacji (*untranslated region* – UTR) genu *MYC* [76].

REGULACJA IMMUNOLOGICZNA

Cząsteczki MHC

Kompleks zgodności tkankowej klasy I (*major histocompatibility complex class I* – MHC-I) składa się z łańcucha kodowanego przez geny *HLA* (*HLAA*, *HLAB* i *HLAC*) i β2-mikroglobuliny. Delekcje lub mutacje inaktywujące w *HLAA*, *HLAB* i *HLAC* występują często w DLBCL, szczególnie w podtypie ABC. Delekcje lub mutacje powodujące inaktywację β2-mikroglobuliny mogą być wykrywane w 29% przypadków DLBCL w podtypie GCB, jak również w ABC. Ponadto obniżony poziom MHC-I spowodowany może być przez brak ekspresji lub nieprawidłową lokalizację cytoplazmatyczną białka B2M/HLA-I, przy braku zmian genetycznych [3, 77]. Obniżenie ekspresji MHC-II zaobserwowano w 40-50% przypadków DLBCL, co korelowało ze złym rokowaniem u tych chorych.

Mechanizmem odpowiedzialnym za redukcję poziomu MHC-II jest inaktywacja genu *CIITA*, który koduje transaktywator MHC-II [78, 79, 80]. Aberracje genu *CIITA*, w tym mutacje, delecje i rearanżacje, są częstsze w GCB (~ 20%) niż w podtypie ABC (~ 10%) i zazwyczaj skutkują zmniejszoną ekspresją MHC klasy II. Ponadto zaobserwowano mutacje w genach *HLA-DMA* i *HLA-DMB*, które zakłócają kompleks MHC klasy II, głównie w podtypie GCB DLBCL (~ 10%) [3].

CD58

CD58 jest ligandem receptora CD2 ulegającego ekspresji na limfocytach T i komórkach NK (*natural killer*), odpowiedzialnym za regulację adhezji i aktywację tych komórek. W 21% przypadków DLBCL wykazano mutacje i delecje genu *CD58*, które występują częściej w podtypie ABC (68%) niż w GCB (32%). Zaobserwowano, że utrata powierzchniowego białka CD58 na komórkach DLBCL zmniejsza skuteczność cytolizowania komórek DLBCL za pośrednictwem komórek NK [77, 81].

PD-L1 i PD-L2

Dodatkowe liczby kopii, amplifikacje i translokacje genów kodujących ligandy dla receptora programowanej śmierci 1/2 (*programmed death receptor ligand 1/2* – PD-L1/PD-L2) wykryto w 27% przypadków DLBCL w podtypie innym niż GCB (*non-DLBCL*) i w około 6% w podtypie GCB [82]. Aberracje genu *PDL1* korelują z nadekspresją PD-L1, ułatwiając w ten sposób wyczerpanie limfocytów T w mikrośrodowisku. Warianty strukturalne, w tym tandemowe duplikacje, inwersje, translokacje i delecje, które zakłócają 3' UTR mRNA *PDL1*, zidentyfikowano w ~ 8% DLBCL. Te zmiany strukturalne potencjalnie zapobiegają wiązaniu pewnych hamujących mikroRNA, prowadząc w ten sposób do zwiększonej ekspresji PD-L1 [83].

INAKTYWACJA BIAŁKA P53

Gen *TP53* znajduje się w chromosomie 17 i koduje białko p53 pełniące funkcje głównego supresora nowotworowego, występującego w komórkach organizmu ludzkiego. Białko to odgrywa istotną rolę w regulacji proliferacji komórek poprzez indukowanie końca cyklu komórkowego, apoptozy lub aktywowanie systemów naprawczych DNA [84]. Inaktywacja białka p53 może być spowodowana przez delecję fragmentu chromosomu 17 zawierającego gen *TP53* lub przez mutacje punktowe w genie *TP53*, prowadzące do powstania nieaktywnego białka. Mutacje w genie *TP53* uniemożliwiają hamowanie fazy G1 cyklu komórkowego oraz powodują deregulację apoptozy, skutkując transformacją nowotworową i proliferacją uszkodzonych komórek [85, 86]. Delecja genu *TP53* występuje w 8-24% przypadków DLBCL, zarówno w podtypie GCB, jak i ABC. Ponadto mutacje punktowe zaobserwowano w około 20% przypadków obu podtypów DLBC i najczęściej są one zlokalizowane w eksonach 5-8, powodując zaburzenie motywu wiążącego DNA, tym samym zakłócając regulację transkrypcji za pośrednictwem p53 [3, 87, 88]. Nowe warianty pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide variations* – SNVs) w obrębie regionu 3' UTR *TP53* zostały również zidentyfikowane w ~ 30% DLBCL [89].

Niedawno pojawiły się dane, które podkreślają potencjalny wpływ mutacji *TP53* i nadekspresji p53 w DHL. Mutacje w genie *TP53* stwierdzono u 20-30% chorych z DHL i uważa się, że przyczyniają się do negatywnego rokowania [90]. W badaniu przeprowadzonym przez Gebauer i wsp. [90] zaobserwowano, że mutacje w genie *TP53* częściej występują w *MYC/BCL2* DHL w porównaniu z klasycznym DLBCL lub DHL z rearanżacjami *MYC/BCL6*. Ponadto Clipson i wsp. [91] stwierdzili, że pacjenci z DLBCL z rearanżacjami *MYC* i mutacjami w genie *TP53* wykazywali gorsze przeżycie niż pacjenci *MYC/BCL2* DHL. Wang i wsp. [67] ocenili także wpływ ekspresji p53 w DLBCL z rearanżacją *MYC*, DLBCL z nadekspresją *MYC*, *MYC/BCL2* DHL i DEL. W tych badaniach, nadekspresję p53 zdefiniowano jako występowanie $\geq 50\%$ komórek pozytywnych i wiązała się ona z negatywnym rokowaniem, szczególnie w DLBCL z rearanżacjami *MYC*, nadekspresją *MYC* i DEL. Podsumowując, dostępne dane sugerują, że zarówno mutacje w genie *TP53*, jak i nadekspresja białka p53 może przyczynić się do gorszego rokowania u pacjentów z DLBCL.

INNE ZMIANY

Mutacje w genie *TNFRSF14*

Gen *TNFRSF14* koduje receptor należący do nadrodziny receptorów błonowych czynnika martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor receptor superfamily member* – TNFR), który ulega ekspresji zarówno w limfocytach B, jak i T [92]. W 30% przypadków DLBCL GCB, mutacje w genie *TNFRSF14* dotyczą eksonów kodujących jego ektodomenę i są to mutacje zmiany sensu (~ 50%), nonsensowne (~ 40%) oraz mutacje powodujące zmianę ramki odczytu (~ 2,5%). W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że wyciszenie tego genu powoduje aktywację proliferacji komórek B i zwiększony rozwój chłoniaków pochodzących z GC [3, 93].

Delecja genu *CDKN2A*

Inhibitor kinazy cyklino-zależnej (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* – *CDKN2A*) jest białkiem supresorowym, zwanym również białkiem p16, kodowanym przez gen *CDKN2A* znajdujący się na chromosomie 9. Odgrywa ono istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego, poprzez inhibicję kinaz cyklino-zależnych CDK4 i CDK6 zapobiega fosforylacji białka Rb. W efekcie białko Rb wiąże kompleks transkrypcyjny E2F i dezaktywuje go. Skutkiem tego działania jest zahamowanie przejścia komórki z fazy G1 cyklu komórkowego w fazę S. Inaktywacja genu zaburza prawidłowe funkcjonowanie cyklu komórkowego, co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek, a w konsekwencji do procesu transformacji nowotworowej [94]. Homozygotyczną delecję genu *CDKN2A* zaobserwowano u około 30% pacjentów z DLBCL, głównie w podtypie ABC [95].

Mutacje w genie *FOXO1*

Czynnik transkrypcyjny *FOXO1* (*Forkhead box protein O1*) odgrywa kluczową rolę podczas różnicowania komórek B i jego aktywność jest negatywnie regulowana przez kaskadę PI3K-AKT i mTOR. Mutacje w genie *FOXO1* zidentyfikowano w 8-10% wszystkich przypadków

DLBCL. Ponadto wykazano, że związane są one ze zmniejszeniem całkowitego czasu przeżycia u chorych DLBCL leczonych R-CHOP niezależnie od pochodzenia komórkowego wg klasyfikacji COO i stopnia ryzyka wg IPI [96]. Występowanie mutacji w genie *FOXO1* wydaje się być związane z gorszym rokowaniem u chorych z nawracającym/opornym DLBCL typu GCB [97].

NOWA MOLEKULARNA KLASYFIKACJA DLBCL

W 2018 r. Schmitz i wsp. [3] przeprowadzili badania na próbkach nowotworowych od 574 pacjentów z DLBCL przy użyciu sekwencjonowania całego egzomu i transkryptomu, analizy liczby kopii DNA oraz głębokiego ukierunkowanego sekwencjonowania aplikonu. Dzięki wdrożeniu odpowiedniego algorytmu analizy badacze zidentyfikowali cztery różne podtypy genetyczne DLBCL: MCD, BN2, N1 i EZH2. W podtypie MCD około 82% przypadków wykazywało mutacje L265P w genie *MYD88* lub mutację/amplifikację genu *CD79B*, w 42% przypadków zaobserwowano jednocześnie obydwa zdarzenia. Ponadto stwierdzono amplifikację genu *SPIB*, mutacje inaktywujące w genie *BLIMP1/PRDM1* oraz występowanie genów supresorowych: *CDKN2A*, *ETV6*, *BTG1* (*B-cell translocation gene 1*) i *BTG2*. Ponadto w 76% przypadków wykazano mutacje lub delecje w genach *H1AA*, *H1AB* lub *H1AC*, a w 30% mutacje w genie *CD58*. Podtyp BN2 był związany głównie z zaburzeniami w szlaku NOTCH, w 73% wykazano mutację/amplifikację genu *NOTCH2* oraz translokację *BCL6* (~ 73%). Ponadto zaobserwowano mutacje w genie *SPEN*, *DTX1*, *TNFAIP3* (~ 55%), mutacje lub amplifikacje genu *PRKCB* i *BCL10* (~ 47%). Podtyp N1 charakteryzował się głównie obecnością mutacji w genie *NOTCH1*, a także aberracjami w genach *TNFAIP3*, *IRF4*, *ID3* i *BCOR*. W podtypie EZB wykazano zmiany genetyczne związane z typem GCB DLBCL i były to głównie translokacje w genie *BCL2*, mutacje w *EZH2* i amplifikacje *REL*, a także inaktywacje genów supresorowych: *TNFRSF14*, *CREBBP*, *EP300* i *KMT2D*. W 38% przypadków EZB wykazano zmiany w genach *S1PR2* i *GNA1314*, w 49% przypadków mutację/amplifikację w genie *STAT6* lub *SOCS1*, w 23% przypadków mutacje w *MTOR* lub amplifikację genu *MIR17HG*, w ~ 39% przypadków zmiany w genach MHC- II, głównie *CIITA* i *HLA-DMA*.

Każdy z tych podtypów posiada unikalne cechy kliniczne, molekularne i transkrypcyjne. W podgrupie ABC wykazano, że chorzy z podtypami MCD i N1 mieli gorsze rokowanie, a z podtypem BN2 mieli lepsze wyniki niż chorzy z innym ABC DLBCL. Podtyp EZB, który wykazywał głównie profil ekspresji genów GCB DLBCL, był związany z gorszym rokowaniem niż w przypadku innych GCB DLBCL. Ponadto zaobserwowano, że podtypy BN2 i EZB były związane z korzystnymi wynikami przeżycia po chemioterapii w porównaniu z podtypami MCD i N1, niezależnie od wyniku IPI.

Chapuy i wsp. [4] również zaproponowali nową klasyfikację

molekularną na podstawie obszernej analizy genomowej u 304 chorych z DLBCL. Stosując inny algorytm klasyfikacji od algorytmu Schmitza i wsp. [3], autorzy zidentyfikowali 5 podgrup DLBCL o wyraźnych cechach genetycznych (C1-C5). W podtypie C1, który charakteryzował DLBCL typu ABC wykazano obecność translokacji *BCL6* oraz mutacji w genie *NOTCH2* lub *SPEN*, co sugeruje, że podtyp C1 i podtyp BN2 zaproponowany przez Schmitza i wsp. [3] są identyczne. Podtyp C3, który obejmuje głównie DLBCL typu GCB, związany był z obecnością translokacji *BCL2*, zmianami genetycznymi zakłócającymi regulatory epigenetyczne (*KMT2D*, *CREBBP* i *EZH2*) oraz aberracjami wpływającymi na *PTEN*, co sugeruje, że podtyp C3 i EZB są podobnymi jednostkami. W podtypie C5 zaobserwowano współwystępowanie mutacji L265P w genie *MYD88* i mutacji w genie *CD79B*, co jest cechą charakterystyczną podtypu MCD opisanego przez Schmitza i wsp. [3]. Natomiast podtyp C2 nie był związany z klasyfikacjami GCB i ABC DLBCL, charakteryzował się białeliczną inaktywacją *TP53* oraz delecją *CDKN2A*. W podtypie C4, który obejmował przypadki DLBCL typu GCB zaobserwowano nieprawidłowości w szlakach sygnałowych: BCR-PI3K, NFκB lub RAS-JAK, mutacje w genach histonów i w cząsteczkach zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną (CD83 CD70 i CD58). Ta grupa badaczy wykazała również występowanie małej podgrupy DLBCL – podtyp C0, który charakteryzował się brakiem mutacji wiodących.

Badania Schmitz i wsp. [3] oraz Chapuy i wsp. [4] pokazują, że klasyfikacja DLBCL na podstawie aberracji genetycznych ma znaczenie kliniczne. Te klasyfikacje molekularne nie tylko dostarczają nowego spojrzenia na patogenezę DLBCL, ale także mogą pomóc klinicyście w identyfikacji pacjentów, u których standardowa immunochemioterapia najprawdopodobniej nie przyniesie skutku i będą musieli skorzystać z innych terapii.

Wkład autorów / Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu / Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie / Financial support

Nie występuje.

Etyka / Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami UE oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo References

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375–90.
- [2] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503–11.
- [3] Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and aetiology of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2018;378(15):1396–407.
- [4] Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018;24(5):679–90.
- [5] Ye BH, Lista F, Lo Coco F, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 1993;262(5134):747–50.
- [6] Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93(14):6947–52.
- [7] Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 1997;16(2):161–70.
- [8] Ci W, Polo JM, Cerchiotti L, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 2009;113(22):5536–48.
- [9] Phan RT, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 2005;6(10):1054–60.
- [10] Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004;432(7017):635–39.
- [11] Ranuncolo SM, Polo JM, Dierov J, et al. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 2007;8(7):705–14.
- [12] Ranuncolo SM, Polo JM, Melnick A. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41(1):95–9.
- [13] Saito M, Novak U, Piovan E, et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106(27):11294–99.
- [14] Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, Yu X, Staudt LM, Calame KL. Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 2004;173(2):1158–65.
- [15] Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17(1):51–62.
- [16] Iqbal J, Greiner TC, Patel K, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21(11):2332–43.
- [17] Ye BH, Chaganti S, Chang CC, et al. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 1995;14(24):6209–17.
- [18] Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101(8):2914–23.
- [19] Wang X, Li Z, Naganuma A, Ye BH. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(23):15018–23.
- [20] Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, et al. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol* 2013;14(10):1084–92.
- [21] Duan S, Cermak L, Pagan JK, et al. FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature* 2012;481(7379):90–3.
- [22] Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471(7337):189–95.
- [23] Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, et al. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B Cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2010;18(6):568–79.
- [24] Calado DP, Zhang B, Srinivasan L. Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell* 2010;18(6):580–9.
- [25] Martins G, Calame K. Regulation and Functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2008;26(1):133–69.
- [26] Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010;463(7277):88–92.
- [27] Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319(5870):1676–79.
- [28] Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, et al. BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2009;40(5):645–52.
- [29] Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, et al. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 1999;96(1):35–45.
- [30] Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470(7332):115–19.
- [31] Dubois S, Viailly PJ, Bohers E, et al. Biological and clinical relevance of associated genomic alterations in MYD88 L265P and non-L265P-mutated diffuse large B-cell lymphoma: Analysis of 361 cases. *Clin Cancer Res* 2017;23(9):2232–44.
- [32] Lam LT, Wright G, Davis RE, et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-kappaB pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007;111(7):3701–13.
- [33] Wang JQ, Jeelall YS, Humburg P, et al. Synergistic cooperation and crosstalk between MYD88^{L265P} and mutations that dysregulate CD79B and surface IgM. *J Exp Med* 2017;214(9):2759–76.

- [34] Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459(7247):717–21.
- [35] Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 2009;459(7247):712–6.
- [36] Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):1052–60.
- [37] Gilmore TD, Kalaitzidis D, Liang MC, Starczynowski DT. The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene* 2004;23(13):2275–86.
- [38] Li L, Xu-Monette ZY, Ok CY, et al. Prognostic impact of c-Rel nuclear expression and *REL* amplification and crosstalk between c-Rel and the p53 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2015;6(27):23157–80.
- [39] Wang X, Cao X, Sun R, et al. Clinical Significance of PTEN Deletion, Mutation, and Loss of PTEN Expression in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Neoplasia* 2018;20(6):574–93.
- [40] Pfeifer M, Grau M, Lenze D, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(30):12420–25.
- [41] Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, et al. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2009;100(5):920–26.
- [42] 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):677–92.
- [43] Caganova M, Carrisi C, Varano G, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2013;123(12):5009–22.
- [44] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010;42(2):181–5.
- [45] Shilatifard A. The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem* 2012;81(1):65–95.
- [46] Zhang J, Dominguez-Sola D HS, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med* 2015;21(10):1190–8.
- [47] Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011;476(7360):298–303.
- [48] Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 2011;43(9):830–7.
- [49] Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med* 2015;21(10):1199–208.
- [50] Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 2000;14(13):1553–77.
- [51] Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet* 2002;32(4):606–13.
- [52] Jiang Y, Ortega-Molina A, Geng H, et al. CREBBP inactivation promotes the development of HDAC3-dependent lymphomas. *Cancer Discov* 2017;7(1):38–53.
- [53] Zhang J, Vlasevska S, Wells VA, et al. The CREBBP acetyltransferase is a haploinsufficient tumor suppressor in B-cell lymphoma. *Cancer Discov* 2017;7(3):322–37.
- [54] Hashwah H, Schmid CA, Kasser S, et al. Inactivation of CREBBP expands the germinal center B cell compartment, down-regulates MHCII expression and promotes DLBCL growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(36):9701–6.
- [55] Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 2014;51(3):219–27.
- [56] Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004;165(1):159–66.
- [57] Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997;90(3):1168–74.
- [58] Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2012;26(6):1383–90.
- [59] Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, et al. Loss of signalling via G α 13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* 2014;516(7530):254–8.
- [60] Cattoretti G, Mandelbaum J, Lee N, et al. Targeted disruption of the S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor gene leads to diffuse large B-cell lymphoma formation. *Cancer Res* 2009;69(22):8686–92.
- [61] Green JA, Cyster JG. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol Rev* 2012;247(1):36–51.
- [62] Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4(1):1–24.
- [63] Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 2007;448(7152):445–51.
- [64] Dominguez-Sola D, Victoria GD, Ying CY, et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* 2012;13(11):1083–91.
- [65] Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol* 2015;52(2):97–106.
- [66] Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010;28(20):3360–5.
- [67] Wang XJ, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, et al. P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2017;30(2):194–203.
- [68] Aukema SM, Siebert R, Schuurung E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011;117(8):2319–31.
- [69] Landsburg DJ, Petrich AM, Abramson JS, et al. Impact of oncogene rearrangement patterns on outcomes in patients with double-hit non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2016;122(4):559–64.
- [70] Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both *BCL2* and *MYC* translocations. *Haematologica* 2009;94(7):935–43.
- [71] Pedersen MØ, Gang AO, Poulsen TS, et al. Double-hit BCL2/ MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma – a single centre’s experience. *Eur J Haematol* 2012;89(1):63–71.

- [72] Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30(28):3452–9.
- [73] Hu S, Xu-monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013;121(20):4021–31.
- [74] Lu T-X, Fan L, Wang L, et al. MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2015;6(21):18374–88.
- [75] Stasik CJ, Nitta H, Zhang W, et al. Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2010;95(4):597–603.
- [76] Xu-Monette ZY, Deng Q, Manyam GC, et al. Clinical and biologic significance of MYC genetic mutations in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016;22(14):3593–605.
- [77] Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, et al. Combined genetic inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2011;20(6):728–40.
- [78] Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 2004;103(11):4251–8.
- [79] Mottok A, Woolcock B, Chan FC, et al. Genomic alterations in CIITA are frequent in primary mediastinal large B cell lymphoma and are associated with diminished MHC Class II expression. *Cell Rep* 2015;13(7):1418–31.
- [80] Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 2011;471(7338):377–81.
- [81] Moingeon P, Chang HC, Wallner BP, Stebbins C, Frey AZ, Reinherz EL. CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 1989;339(6222):312–4.
- [82] Georgiou K, Chen L, Berglund M, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2016;127(24):3026–34.
- [83] Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst* 2015;108(1):1–9.
- [84] Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2014;14(5):359–70.
- [85] Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351(6326):453–6.
- [86] el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54(5):1169–74.
- [87] Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* 2012;119(16):3668–83.
- [88] Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012;120(19):3986–96.
- [89] Li Y, Gordon MW, Xu-Monette ZY, et al. Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013;121(22):4529–40.
- [90] Gebauer N, Bernard V, Gebauer W, Thorns C, Feller AC, Merz H. TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations. *Leuk Lymphoma* 2015;56(1):179–85.
- [91] Clipson A, Barrans S, Zeng N, et al. The prognosis of MYC translocation positive diffuse large B-cell lymphoma depends on the second hit. *J Pathol Clin Res* 2015;1(3):125–33.
- [92] Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev* 2011;244(1):169–87.
- [93] Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell* 2016;167(2):405–18.
- [94] Jardin F, Jais JP, Molina TJ, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* 2010;116(7):1092–104.
- [95] Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med* 2013;210(11):2273–88.
- [96] Trinh DL, Scott DW, Morin RD, et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121(18):3666–74.
- [97] Morin RD, Assouline S, Alcaide M, et al. Genetic landscapes of relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 2016;22(9):2290–300.