

Struktura genetyczna chłoniaków rozlanych z dużych komórek B: od mikromacierzy DNA do celowanej terapii

Genetic structure of diffuse large B-cell lymphomas: from DNA microarrays to targeted therapy

Przemysław Juszczynski

Harvard Medical School, Dana Farber Cancer Institute, Boston

Streszczenie

Chłoniaki rozlane z dużych komórek B (DLBCL) stanowią niezwykle heterogenną grupę chorób w zakresie cech klinicznych, genetycznych i molekularnych. Globalna analiza ekspresji genów techniką mikromacierzy znacznie pogłębiła wiedzę dotyczącą przyczyn tej heterogenności dzięki wykazaniu różnic transkrypcyjnych między różnymi typami histologicznymi nowotworu, podobieństw między komórkami nowotworowymi i prawidłowymi limfocytami oraz poprzez zdefiniowanie podtypów molekularnych DLBCL. Techniki te ujawniły również odrębne mechanizmy patogenetyczne w obrębie DLBCL, które mogą być celem terapii celowanych. Nowe eksperymentalne strategie terapeutyczne blokujące sygnał receptora B-komórkowego, szlak czynnika jądrowego κB ($NF\kappa B$) oraz interakcje komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem są w trakcie badań klinicznych. Dalsze poszerzanie wiedzy dotyczącej heterogenności DLBCL i zgłębienie ich mechanizmów patogenetycznych rodzi uzasadnione nadzieje na poprawę wyników leczenia tej grupy chłoniaków.

Słowa kluczowe: mikromacierze DNA, klasyfikacja molekularna, DLBCL, PMLBCL, leczenie celowane

Hematologia 2010; 1: 15–28

Abstract

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) exhibits striking heterogeneity at the clinical, genetic, and molecular levels. Microarray-based gene expression profiling has greatly improved our understanding of the molecular heterogeneity within DLBCL by highlighting differences between clinically defined tumor subtypes, similarities between subsets of tumors and normal B cells, and by defining robust subtypes with comprehensive transcriptional signatures. Such strategies have suggested distinct pathogenetic mechanisms and have identified promising therapeutic targets. Novel therapies conceived by gene expression profiling are under investigation and include those targeting B-cell receptor signaling, $NF\kappa B$ pathway and microenvironment with monoclonal antibody-based therapies. Increasing molecular understanding of the heterogeneous subsets within DLBCL will likely improve the current empiric therapy of DLBCL by identifying rational therapeutic targets in specific disease subtypes.

Key words: DNA microarrays, molecular classification, DLBCL, PMLBCL, targeted therapy

Hematologia 2010; 1: 15–28

Adres do korespondencji: Przemysław Juszczynski, MD, PhD, Harvard Medical School, Dana Farber Cancer Institute, 44 Binney Street, Room M515, Boston, MA 02115, tel.: (617) 632 4749, faks: (617) 632 4734, e-mail: przemyslaw_juszczynski@dfci.harvard.edu

Biologiczne uwarunkowania heterogenności chłoniaków rozlanych z dużych komórek B

Chłoniaki rozlane z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) stanowią najczęstszy typ chłoniaka nieziarnicznego u dorosłych i niezwykle heterogenną grupę chorób — zarówno w zakresie cech morfologicznych, biologicznych, jak i klinicznych. Prawidłowym odpowiednikiem komórki nowotworowej w DLBCL jest germinalny lub postgerminalny limfocyt B, który po kontakcie z antygenem uległ nowotworowej transformacji [1]. Limfocyty germinalne są szczególnie narażone na uszkodzenia DNA i nowotworową transformację z racji zachodzących w nich fizjologicznych procesów remodelingu DNA — hipermutacji somatycznych (SHM, *somatic hypermutations*) oraz zmiany klas (CSR, *class switch recombination*) [2]. Procesy te polegają na edycji genów immunoglobulinowych i prowadzą do dywersyfikacji repertuaru przeciwciał oraz zwiększają ich powinowactwo do antygeny. Ponieważ w trakcie SHM i CSR dochodzi do przejściowego powstania pęknięć podwójnej nici DNA, limfocyty germinalne są naturalnie narażone na powstanie translokacji i mutacji w obrębie onkogenów (tab. 1) [3]. Złożoność mechanizmów molekularnych, leżących u podstaw patogenezy chłoniaków DLBCL, znajduje swoje odzwierciedlenie w ich zróżnicowaniu klinicznym. Dostępne obecnie strategie terapeutyczne pozwalają

na wyleczenie ponad połowy chorych. Kliniczne modele prognostyczne pozwalają zidentyfikować grupy chorych o zróżnicowanym rokowaniu i wpływają na rodzaj prowadzonego leczenia, lecz ich zastosowanie ma charakter wyłącznie opisowy i nie odzwierciedla molekularnych uwarunkowań, które mogą wpływać na kliniczną charakterystykę choroby w indywidualnym przypadku [19]. Dopiero postęp w zakresie biologii systemowej i analiz wielkoskalowych eksperymentów genetycznych z użyciem mikromacierzy, jaki się dokonał w ciągu ostatnich lat, pozwolił na uzyskanie szczegółowych sygnatur molekularnych u poszczególnych pacjentów oraz na zdefiniowanie wewnętrznej molekularnej substruktury w ramach tej grupy chłoniaków. Badania te rzuciły nowe światło na mechanizmy patogenetyczne w DLBCL i otworzyły drogę do nowych terapii celowanych.

Zastosowanie mikromacierzy w badaniach heterogenności DLBCL

Mikromacierze DNA to technologia umożliwiająca równoczesną analizę ekspresji wielu tysięcy genów i uzyskanie całościowego obrazu transkryptomu nowotworu. Analiza i interpretacja wyników takich eksperymentów wymaga zastosowania techniki inżynierii wstecznej (*reverse engineering*), czyli cyfrowych algorytmów pozwalających na wyodrębnienie z zebranych danych mechanizmów odpowie-

Tabela 1. Zaburzenia genetyczne w chłoniakach rozlanych z dużych komórek B (DLBCL)

Table 1. Recurrent genetic abnormalities in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)

Defekt genetyczny	Częstość [piśm.]	Lokalizacja	Mechanizm deregulacji
<i>BCL6</i>	35–40% [3]	3q27	t(3;...), SHM
<i>BCL2</i>	t(14;18) — 13% [4] Amplifikacje — 24% [5]	18q21	t(14;18) i amplifikacje
<i>cMYC</i>	15% [6–7]	8q24	t(8;...) i SHM
<i>FAS</i>	20% [8]	10q24	Mutacje DD, SHM
<i>SHM</i>	45% [9]	<i>BCL6, PIM1, cMYC, PAX5, Rho/TTF, FAS</i>	Substytucje jednonukleotydowe
<i>P53</i>	16% [10]	17p	Mutacje, delecje
<i>ATM</i>	15% [11]	11q	Delecje, mutacje
<i>SPIB</i>	19–26% [12, 13]	19q	Translokacje, amplifikacje
<i>FOXP1</i>	26% [12, 14]	3p	Trisomia 3, translokacje, amplifikacje
<i>PRDM1</i>	24% [15]	6q21	Mutacje, delecje
<i>CARD11</i>	8–11% [16]	7p22	Mutacje domeny <i>coiled-coil</i>
<i>A20 (TNFAIP3)</i>	2,3–24% [17]	6q23	Mutacje
<i>INK4a/ARF</i>	21% [12]	9p21	Mutacje, delecje
<i>cREL</i>	3–17% [18]	2p12-16	Amplifikacje
mir-17-92	Do 12,5% [12]	13q	Amplifikacje

SHM (*somatic hypermutations*) — hipermutacje somatyczne

działnych za nowotworowy fenotyp badanych komórek. Wnioski, jakie z tych eksperymentów można wyciągnąć, zależą od sposobu sformułowania hipotezy i rodzaju przeprowadzonej analizy. Analizy nadzorowane (*supervised analyses*) polegają na scharakteryzowaniu różnic w ekspresji genów między dwoma zdefiniowanymi *a priori* fenotypami, na przykład DLBCL o dobrym i złym rokowaniu lub DLBCL węzłowych i DLBCL o innych pierwotnych lokalizacjach. Analizy tego typu pozwalają zdefiniować transkrypty/sygnatury warunkujące biologiczną charakterystykę guza, na przykład odpowiedzialne za tropizm narządowy lub warunkujące większą agresywność nowotworu. Analizy nienadzorowane (*unsupervised analyses*) umożliwiają wyodrębnienie molekularnych podkategorii w ramach jednostki diagnostycznej bez formułowania założeń dotyczących ich liczby i natury. Zarówno liczba podkategorii, jak i ich charakterystyka są odzwierciedleniem dominującej struktury genetycznej w obrębie analizowanych danych. Celem sterowanych analiz nadzorowanych, podobnie jak analiz nienadzorowanych, jest zidentyfikowanie podkategorii molekularnych DLBCL, jednak przy założeniu, że charakterystyka molekularna DLBCL powinna odzwierciedlać podobieństwa do prawidłowych limfocytów B [20].

Możliwość uzyskania całościowego obrazu transkryptomu, jaką przyniosły mikromacierze, całkowicie zmieniła sposób prowadzenia podstawowych badań genetycznych w chorobach nowotworowych. Dotychczas takie badania prowadzono w sposób celowany na pojedyncze geny, których ekspresja różniła się w komórce nowotworowej i jej prawidłowym odpowiedniku lub, na przykład, u pacjentów z różnym przebiegiem choroby. Mikromacierze pozwoliły na analizę takich różnic w ujęciu globalnym. Różnica, choć początkowo wydawała się tylko „ilościowa”, okazała się sięgać daleko głębiej. Wraz z rozwojem nowych narzędzi analizy statystycznej, dzięki mikromacierzom zdołano uzyskać więcej niż statyczny obraz transkryptomu różnicujący dwa stany biologiczne — uzyskano dynamiczny obraz nowotworowego fenotypu warunkowany przez aktywowane/inaktywowane komórkowe szlaki sygnałowe i metaboliczne oraz interakcje nowotworu z mikrośrodowiskiem.

Różnice molekularne między chłoniakami o różnych pierwotnych lokalizacjach: PMLBCL i pierwotne DLBCL ośrodkowego układu nerwowego

Możliwość zbadania i zrozumienia powiązań między transkryptomem nowotworu i jego fenotypem, jaką przyniosły mikromacierze, wykorzystano

do wykazania genetycznych różnic między chłoniakami o różnych pierwotnych lokalizacjach [21–22]. Pierwotne śródpiersiowe chłoniaki z dużych komórek B (PMLBCL, *primary mediastinal large B-cell lymphoma*) różnią się klinicznie i patomorfologicznie od DLBCL. Chłoniaki te charakteryzują się brakiem ekspresji powierzchniowych receptorów B-komórkowych (BCR, *B-cell receptor*), rzadszymi translokacjami *BCL2* i *BCL6* oraz częstszymi amplifikacjami regionu 9p24 [22]. Różnice kliniczne, patomorfologiczne i cytogenetyczne sugerowały również istnienie różnic transkrypcyjnych między PMLBCL i DLBCL. Porównanie profilu ekspresji genów w tych dwóch chorobach wykazało istotne różnice między PMLBCL i DLBCL, które mogą warunkować ich odmienną charakterystykę kliniczną, fenotypową i histopatologiczną [21–22]. Pierwotne śródpiersiowe chłoniaki z dużych komórek B charakteryzowały się niższą ekspresją genów kaskady sygnałowej BCR, antygenów leukocytów ludzkich (HLA, *human leukocyte antigens*) i markerów limfocytów germinalnych. W odróżnieniu od DLBCL, PMLBCL charakteryzują się wyższą ekspresją genów cytokinowych (IL-13, *interleukin 13*) i białek transdukcji sygnału z receptorów cytokinowych (JAK2), genów indukowanych przez interferon (IFN), czynnik martwicy nowotworów (TNF, *tumor necrosis factor*), molekuł adhezyjnych i kostymulacyjnych [21–22]. Istotną częścią sygnatury molekularnej PMLBCL była nadekspresja genów regulowanych przez czynnik jądrowy κ B (NF κ B, *nuclear factor kappa B*), w tym TRAF-1. Do aktywacji NF κ B prowadzą częstsze amplifikacje genetyczne dotyczące *locus* c-Rel oraz interakcje z mikrośrodowiskiem, a celowana inhibicja aktywności tego czynnika transkrypcyjnego powodowała apoptozę w liniach komórkowych PMLBCL [18]. W PMLBCL obserwowano również wyższą ekspresję PD-L2 — białka z rodziny kostymulatorów B7 funkcjonującego jako ligand T-komórkowego receptora PD-1 (*programmed death-1*) [21, 23–24]. Aktywacja receptora PD-1 na powierzchni komórki T przez jego ligandy prowadzi do zmniejszonej proliferacji w odpowiedzi na antygen, zmniejszonej produkcji IFN γ , zaburzeń degranulacji i obniżonej cytotoxyczności, określanych wspólnie jako zjawisko „wyczerpania” (*T-cell exhaustion*) [23–24]. Zjawisko to może w znacznym stopniu ograniczać skuteczność odpowiedzi immunologicznej gospodarza na obecność nowotworu. Obserwacje te wskazują na odmienne mechanizmy patogenetyczne w PMLBCL, obejmujące istotny udział mikrośrodowiska w tym procesie, i nasuwają podobieństwa do klasycznych postaci chłoniaka Hodgkina (cHL, *classical Hodgkin lymphoma*).

Zatem różnice genetyczne, odzwierciedlające odrębne mechanizmy patogenetyczne między PMLBCL i DLBCL, w pełni uzasadniają wyodrębnienie PMLBCL jako osobnej jednostki chorobowej, a ponadto uściślają jej kryteria diagnostyczne (szczegóły niżej) i wskazują na istnienie mechanizmów warunkujących wzrost nowotworu, które mogą być obiektem celowanej interwencji terapeutycznej.

O ile patogenetyczne znaczenie odrębności genetycznej PMLBCL wydaje się zrozumiałe, o tyle wyjaśnienie przyczyn tych różnic pozostaje osobną kwestią. W przypadku PMLBCL różnice te są przynajmniej częściowo uwarunkowane pochodzeniem ontogenetycznym komórek nowotworowych z granicznych limfocytów B, innym niż w przypadku DLBCL [25–26]. W przypadku pierwotnych DLBCL o lokalizacji w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) komórki nowotworowe wywodzą się z tych samych prekursorów, co DLBCL o typowych lokalizacjach węzłowych, czyli limfocytów germinalnych lub postgerminalnych [27–29]. Tropizm narządowy pierwotnych DLBCL OUN nie jest zatem wynikiem różnic ontogenetycznych, a wynika raczej z odrębności w charakterystyce molekularnej komórek chłoniakowych wykazujących predylekcję do OUN. Pierwotne DLBCL OUN wykazują wyższą niż DLBCL o innych lokalizacjach (w tym węzłowych i pozawęzłowych) ekspresję genów dla molekuł adhezyjnych i genów aktywowanych wskutek interakcji z podścieliskiem oraz genów związanych z migracją i aktywacją limfocytów [30]. Istotnym elementem molekularnej sygnatury pierwotnych DLBCL OUN jest aktywacja genów kaskady prze-

kazywania sygnału i regulowanych przez interleukinę 4 (IL-4, *interleukin 4*), w tym JAK1, STAT6 i XBP-1. Ponieważ źródłem IL-4 mogą być komórki śródbłonna w OUN, mechanizm ten może tłumaczyć angiotropizm pierwotnych DLBCL o tej lokalizacji narządowej [31]. Ponadto chłoniaki o tej lokalizacji, znacznie częściej niż węzłowe, cechuje utrata informacji genetycznej chromosomu 6p związana z niższą ekspresją HLA klasy I i II [32–33]. Zjawisko to dotyczy również częściej pierwotnych DLBCL jądra, sugerując wspólny mechanizm patogenetyczny w chłoniakach o pierwotnej lokalizacji w miejscach uprzywilejowania immunologicznego [33].

Molekularna klasyfikacja *Cell of Origin* (COO): identyfikacja substruktury molekularnej DLBCL na podstawie analizy podobieństw komórek nowotworowych do prawidłowych limfocytów

Pierwsze próby poznania i usystematyzowania wewnętrznej heterogenności DLBCL na podstawie ich molekularnych cech przeprowadzono przy założeniu, że komórki nowotworowe powinny wykazywać cechy prawidłowych limfocytów B o różnym stopniu zróżnicowania i aktywacji [20]. Na podstawie tych badań wyodrębniono dwie klasy DLBCL, odzwierciedlające stopień zróżnicowania prawidłowego limfocyta B, który uległ transformacji, i różniące się mechanizmami patogenetycznymi (tab. 2). Pierwszą z nich, nazwaną GCB (*germinal center B-cell*), charakteryzowała ekspresja genów ulegają-

Tabela 2. Charakterystyka molekularna DLBCL z aktywowanych komórek B (ABC) i z komórek B ośrodków rozmnażania (GCB)

Table 2. Molecular features of activated B-cell (ABC) and germinal center B-cell (GCB) DLBCL subtypes

	GCB	ABC
Pochodzenie ontogenetyczne	Germinalny limfocyt B	Postgerminalny limfocyt B
Aberracje chromosomalne	t(14;18) (<i>BCL2</i>) Amplifikacje 13q (mir-17-92?) Amplifikacje 2p (<i>cREL</i>) Amplifikacje 12q (<i>MDM?</i>) Delecje 10q (<i>PTEN?</i>) Delecje 1p (<i>TP73?</i>)	Amplifikacje 19q (<i>SPIB</i>) Aberracje 3p (<i>FOXP1</i>) Delecje 6q21-q22 Delecje 9p21 (<i>INK4a/ARF</i>)
Mechanizmy onkogenne	Translokacje <i>BCL2</i> Deregulacja <i>BCL6</i>	Konstitutywna aktywność NFκB Delecje <i>PRDM1</i> Translokacje <i>SPIB</i> Nadekspresja <i>BCL2</i> , <i>MYC</i>
Aktywne mutacje Ig	Tak	Nie
Rokowanie	Lepsze	Gorsze

NFκB (*nuclear factor kappa B*) — czynnik jądrowy κB

cych ekspresji w trakcie reakcji germinalnej, a zwłaszcza jej kluczowego regulatora — czynnika transkrypcyjnego BCL6 [20, 34]. Profil ekspresji drugiej grupy, nazwanej ABC (*activated B-cell*), był zbliżony do obwodowych limfocytów B aktywowanych mitogenicznie *in vitro* i obejmował między innymi nadekspresję genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny NFκB oraz nadekspresję onkogenu MYC [20, 34].

Chłoniaki typu GCB charakteryzują się deregulacją ekspresji onkogenu BCL6 i aktywną SHM genów immunoglobulinowych [35]. Konstytutywna, wyższa niż w pozostałych grupach, ekspresja BCL6 wydaje się podstawowym czynnikiem warunkującym molekularne podobieństwo komórek nowotworowych do centroblastów/centrocytów, ponieważ ten czynnik transkrypcyjny jest niezbędny do inicjacji i prawidłowego przebiegu reakcji w obrębie ośrodków rozmnażania. W chłoniakach GCB-DLBCL częstsze są również amplifikacje regionu 12q, obejmującego *locus MDM2*. Amplifikacja *MDM2* — negatywnego regulatora p53 prowadzi do funkcjonalnego wyłączenia p53. Podobne konsekwencje może mieć utrata kopii genu *p73*, kodującego białko z rodziny p53 o charakterystyce nowotworowego genu supresorowego [12].

Najbardziej charakterystyczną cechą chłoniaków DLBCL o charakterystyce ABC jest konstytutywna aktywność czynnika transkrypcyjnego NFκB [17, 36]. Aktywacja NFκB w warunkach fizjologicznych jest ściśle regulowana i zależy od aktywacji powierzchniowych receptorów, między innymi BCR i/lub CD40 [37]. Aktywacja NFκB, w odpowiedzi na wiązanie ligandu CD40, prowadzi do zakończenia programu reakcji germinalnej oraz dalszego różnicowania w kierunku limfocyta B pamięci lub komórki plazmatycznej [2]. W mechanizmie tym istotną rolę odgrywa również aktywacja czynników transkrypcyjnych IRF4 i PRDM1 [2]. Utrata lub dysfunkcja tych mechanizmów powoduje zablokowanie różnicowania komórki B na etapie limfocyta postgerminalnego. Konstytutywna aktywność NFκB i IRF4, częstsze mutacje inaktywujące PRDM1 oraz niższa ekspresja BCL6 w tej grupie chłoniaków sugerują, że wywodzą się one właśnie z tego etapu ontogenetycznego [15, 20]. Jądrowa lokalizacja NFκB, świadcząca o jego aktywności, występuje w ponad 60% przypadków chłoniaków o tej charakterystyce [17]. Głównym mechanizmem aktywacji tej ścieżki sygnałowej są obecne w ponad 50% przypadków mutacje somatyczne dotyczące genów kodujących białka regulujące aktywność NFκB, w tym: *A20*, *RANK*, *TRAF2*, *TRAF5*, *TAK1* i *CARD11* [17]. *CARD11* jest białkiem kompleksu

CBM (*CARD11-BCL10-MALT1*) niezbędnym do aktywacji NFκB w odpowiedzi na niektóre sygnały, a jego obecność jest niezbędna do utrzymania aktywności NFκB w części chłoniaków ABC-DLBCL i ich wzrostu [16, 38–39]. Konsekwencją konstytutywnej aktywności NFκB jest między innymi ekspresja genów warunkujących progresję cyklu komórkowego i proliferację (cyklina D2) oraz genów antyapoptotycznych (*BCL2*, *BFL1/A1*, *BCL-xL*, *TRAF-1*, *TRAF-2*, *c-IAP*, *cFLIP*) [18].

Inny stopień zróżnicowania prawidłowego limfocyta ulegającego transformacji w chłoniakach DLBCL-GCB i -ABC w znacznym stopniu determinuje ich charakterystykę biologiczną i kliniczną. Limfocyty germinalne są komórkami szybko proliferującymi, w których zachodzą losowe zjawiska edycji genów immunoglobulinowych, mające na celu zwiększenie powinowactwa powstającego przeciwciała do antygeny [2]. Znaczna część tych edycji powoduje zmniejszenie powinowactwa lub wręcz utratę funkcjonalnego BCR i w konsekwencji apoptotyczną śmierć limfocyta. Ten unikatowy proces wymaga zatem, z jednej strony, wysokiej aktywności proliferacyjnej przy zachodzących fizjologicznych uszkodzeniach DNA, a z drugiej — wysokiej gotowości apoptotycznej, egzekwowanej przy braku egzogennych sygnałów podtrzymujących proces proliferacji [2]. Limfocyty postgerminalne, które zakończyły proces edycji genów immunoglobulinowych i wskutek interakcji z limfocytami T otrzymały sygnał do zakończenia reakcji germinalnej, nie wymagają gotowości apoptotycznej charakterystycznej dla swoich prekursorów, proliferują intensywnie i rozpoczynają różnicowanie w kierunku komórek plazmatycznych [2]. Zgodnie z tą biologiczną charakterystyką chłoniaki typu GCB klinicznie cechują się lepszym rokowaniem niż chłoniaki ABC. Różnice w odpowiedzi na leczenie dotyczą zarówno chorych leczonych rytuksymabem, jak i chorych poddanych chemioterapii wielolekowej bez użycia tego przeciwciała i są czynnikiem prognostycznym niezależnym od międzynarodowego indeksu prognostycznego (IPI, *International Prognostic Index*) [20, 34, 40–41].

Mimo arbitralności założeń klasyfikacji *Cell of Origin* (COO), jej prognostyczne znaczenie, intuicyjność i różne mechanizmy patogenetyczne w obrębie grup ABC i GCB przyczyniły się do dużego sukcesu tego podziału, który uwzględniono w klasyfikacji nowotworów limfoidalnych według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Jednak w klasyfikacji COO, z założenia, zidentyfikowano tylko dwie grupy, pozostawiając 17–40% chorych bez przydziału do żadnej

z nich [4, 34]. Istotnym problemem wydaje się również przyjęcie spójnych kryteriów klasyfikacyjnych. Kryteria klasyfikacji COO ewoluowały w kolejnych badaniach, a stopień powtarzalności tych systemów klasyfikacyjnych, zwłaszcza w zakresie predykcji przynależności do niezdefiniowanej kategorii 3, był niezadowolający [20, 34, 42–43]. Zatem klasyfikacja ta nie jest w stanie opisać całej heterogenności molekularnej w obrębie chłoniaków DLBCL. Istnienie dodatkowej, pomijanej w klasyfikacji COO, substruktury w obrębie tej grupy chorób sugerują również badania wskazujące na istnienie sygnatur prognostycznych, niezależnych od klasyfikacji COO, które rokowniczo stratyfikują chorych również w obrębie grup ABC i GCB [34, 44]. Wyodrębnione sygnatury prognostyczne odzwierciedlają procesy proliferacyjne, proces reakcji germinalnej oraz interakcje z mikrośrodowiskiem lub wręcz samą charakterystykę mikrośrodowiska (sygnatura MHC II, sygnatura węzłowa i sygnatury stromalne). Z wyjątkiem sygnatury proliferacyjnej, która ma związek z grupą ABC, i sygnatury germinalnej, związanej z grupą GCB, sygnatury zależne od mikrośrodowiska nie są związane z żadną z tych grup, a wykazują istotne znaczenie prognostyczne [34, 44]. Ponieważ w klasyfikacji COO chłoniaki są klasyfikowane na podstawie ich podobieństwa do izolowanych limfocytów B, z definicji rola mikrośrodowiska jest wykluczona. Obserwacje te mają dwie istotne implikacje: po pierwsze dowodzą, że klasyfikacja COO upraszcza strukturę molekularną DLBCL i jest niekompletna; po wtóre, wskazują na istotną rolę mikrośrodowiska w kształtowaniu biologicznej i klinicznej charakterystyki chłoniaka.

Molekularna klasyfikacja *Comprehensive Cluster*: identyfikacja substruktury molekularnej bez założeń *a priori*

Klasyfikacja molekularna chłoniaków DLBCL, przeprowadzona bez założeń *a priori* dotyczących podobieństw komórki nowotworowej do prawidłowych limfocytów, z założenia powinna precyzyjnie oddawać wewnętrzną substrukturę grupy i wyodrębnić kategorie odzwierciedlające dominujące procesy genetyczno-biologiczne. Strukturę taką wyodrębniono z zastosowaniem algorytmów analizy nienadzorowanej, które pozwoliły podzielić grupę 173 chorych na DLBCL na trzy kategorie, charakteryzujące się odmiennym profilem ekspresji genów [4]. Istnienie takiej samej substruktury wykazano w niezależnej grupie 221 chorych [34]. Pierwsza ze zidentyfikowanych grup, nazwana HR (*host response*), charakteryzowała się nadekspresją genów T-komórkowych,

NK-komórkowych, genów komórek dendrytycznych oraz genów regulowanych przez $IFN\gamma$ [4]. Profil ekspresji drugiej ze zidentyfikowanych grup („BCR”, *B-cell receptor signaling/proliferation*) charakteryzowała nadekspresja genów kodujących białka BCR i kaskady transdukcji sygnału z tego receptora, niektóre B-komórkowe czynniki transkrypcyjne oraz białka biorące udział w naprawie DNA i progresji cyklu komórkowego [4]. Trzecią ze zidentyfikowanych grup („OXP”, *oxidative phosphorylation*) charakteryzowała nadekspresja genów mitochondrialnych białek łańcucha transportu elektronów i białek antyapoptotycznych [4].

Profil ekspresji genów w chłoniakach typu HR był w znacznym stopniu uwarunkowany histopatologiczną architekturą podścieliska nowotworu, nacieków komórkowych i obejmował nadekspresję genów T- i NK-komórkowych (w tym kaskady receptora T-komórkowego), kaskady dopełniacza i cytokin prozapalnych ($IFN\gamma$ i rodziny TNF). Komórki chłoniakowe częściej niż w innych typach charakteryzowała konstytutywna aktywność i jądrowa lokalizacja czynnika transkrypcyjnego $NF\kappa B$ [4, 18]. Nacieki prozapalne w chłoniakach HR charakteryzowała między innymi obecność limfocytów CD2+/CD3+ i komórek dendrytycznych S100+/GILT+/CD1a-/CD123-, świadczące o aktywnej odpowiedzi immunologicznej [4]. Chłoniaki te charakteryzują się również rzadszymi aberracjami genetycznymi, co może sugerować alternatywne mechanizmy patogenetyczne w tej grupie [4, 45]. Klinicznie, chłoniaki DLBCL typu HR wykazują cechy charakterystyczne dla podtypu DLBCL wyodrębnionego w klasyfikacji WHO, *T-cell/histiocyte-rich* DLBCL, w tym młodszy wiek chorych, częstsze zajęcie szpiku i śledzionowa lokalizacja choroby [4].

Profil ekspresji drugiej ze zidentyfikowanych grup („BCR”) cechowała nadekspresja genów kodujących białka BCR i kaskady transdukcji sygnału z tego receptora (w tym śledzionowej kinazy tyrozynowej [SYK, *spleen tyrosine kinase*]) oraz niektóre B-komórkowe czynniki transkrypcyjne, w tym BCL6 [4]. Zarówno linie komórkowe o charakterystyce molekularnej odpowiadającej chłoniakom typu „BCR”, jak i pierwotne izolowane komórki nowotworowe pobrane od chorych wykazują konstytutywną, toniczną aktywność SYK i jej bezpośredniego substratu, białka adaptorowego BLNK (*B-cell linker protein*) [46]. Na istotną rolę tonicznej aktywności BCR jako czynnika warunkującego przetrwanie prawidłowych i niektórych nowotworowych limfocytów B wskazują rzadkie przypadki utraty powierzchniowych BCR mimo zachodzących aktywnie SHM lub w wyniku zastosowania przeciwciał

antyidiotypowych [3]. Drugą podstawową charakterystyką chłoniaków DLBCL typu „BCR” jest nadekspresja czynnika transkrypcyjnego BCL6 i częstsze translokacje dotyczące tego onkogenu [4]. Chłoniaki DLBCL typu „BCR” wykazują skoordynowany profil ekspresji genów kontrolowanych przez BCL6, odrębny od profilu chłoniaków niezależnych od tego onkogenu, co może sugerować, że program genetyczny uruchamiany przez BCL6 jest w znacznym stopniu odpowiedzialny za biologiczny charakter tej grupy chłoniaków [47]. Istotnych różnic w ekspresji genów regulowanych przez BCL6 nie obserwowano natomiast między chłoniakami klasyfikowanymi jako GCB i ABC według klasyfikacji COO [47].

Trzecią ze zidentyfikowanych grup („OXF”, *oxidative phosphorylation*) charakteryzowała nadekspresja genów mitochondrialnych białek łańcucha transportu elektronów, wskazując na istotną rolę procesów generowania i utylizacji energii w ich patogenezie [4]. Chłoniaki „OXF” wykazywały również częstsze zaburzenia prowadzące do deregulacji egzo- i endogennej ścieżki apoptotycznej, w tym translokacje *locus BCL2*, wyższą ekspresję mitochondrialnych białek antyapoptotycznych z rodziny BCL2, w tym BFL-1/A1, oraz częstsze delecje dotyczące domeny śmierci receptora FAS [4, 45]. Na istnienie alternatywnych mechanizmów patogenetycznych, podtrzymujących proliferację komórek chłoniakowych, wskazuje również częstsza nieobecność lub dysfunkcje powierzchniowych BCR niż w innych grupach [46].

Różnice między klasyfikacjami COO i CCC

Stopień zbieżności między klasyfikacjami COO i CCC jest marginalny i dotyczy tylko części chorych klasyfikowanych jako GCB według klasyfikacji COO i „BCR” według CCC [4]. W przeciwieństwie do klasyfikacji COO, w żadnej z wyodrębnionych grup CCC nie obserwowano różnic w odpowiedzi na chemioterapię [4]. Obserwacje te sugerują zatem, że każda z tych klasyfikacji odzwierciedla inny aspekt biologii DLBCL. Rozbieżności między oboma systemami wydają się bardziej zrozumiałe, gdy weźmie się pod uwagę różnice w założeniach, które przyjęto przy ich opracowaniu. Podstawowym atutem klasyfikacji COO jest jej intuicyjność i — poprzez jej wartość prognostyczną — użyteczność kliniczna. Kryteria tej klasyfikacji również wydają się prostsze do zastosowania w praktyce. „Złotym standardem” wciąż pozostaje klasyfikacja oparta na analizie mikromacierzy (niezależnie od typu użytej platformy), ale klasyfikację tę technicznie można up-

rościć do kilku markerów immunohistochemicznych, które w sposób niedoskonały, ale zadawalający pozwalają na sklasyfikowanie chorych do grup GCB *versus non*-GCB [41–42, 48–49]. Klasyfikacja ta jednak mniej precyzyjnie odzwierciedla mechanizmy patogenetyczne w obrębie DLBCL, począwszy od pominięcia znacznej grupy chłoniaków, które zostają niesklasyfikowane według kryteriów COO, a kończąc na pominięciu roli tonicznego sygnału z BCR. W tym aspekcie przewagę zyskuje klasyfikacja CCC, która z założenia precyzyjniej oddaje wewnętrzną substrukturę grupy i pozwala scharakteryzować patogenetyczne procesy genetyczno-biologiczne warunkujące inicjację i proliferację komórek chłoniakowych. Ponieważ klasyfikacja ta z założenia identyfikuje najbardziej dominującą substrukturę genetyczną, zrozumiałą jest również brak znaczenia prognostycznego klas według CCC. Dominujące sygnatury zidentyfikowane w klasyfikacji CCC odzwierciedlają zróżnicowane mechanizmy patogenetyczne prowadzące do wystąpienia chłoniaka, a nie mechanizmy determinujące jego dalszy przebieg. Innymi słowy, klasyfikacja CCC najprawdopodobniej odzwierciedla te mechanizmy, których limfocyt potrzebuje, by stać się nowotworowym — niezależnie od tego, jakie będą jego dalsze losy i odpowiedź na leczenie.

Implikacje diagnostyczne wielkoskalowych badań molekularnych

Niezależnie od systemu klasyfikacji, scharakteryzowanie odrębnych mechanizmów patogenetycznych u różnych chorych z DLBCL umożliwiło zdefiniowanie nowych „molekularnych” podtypów choroby i nowych potencjalnych terapii celowanych. Z klinicznego punktu widzenia te molekularne podkategorie DLBCL wymagają przynajmniej roboczych kryteriów diagnostycznych, które pozwolą w pełni wykorzystać ich wartość w praktyce. Zrozumienie biologicznej informacji zawartej w danych uzyskanych za pomocą mikromacierzy pozwala na zawężenie sygnatur genetycznych do kilku biomarkerów możliwych do oceny za pomocą standardowej immunohistochemii. Konstitutywna aktywność kanonicznej ścieżki sygnałowej NFκB (oceniana jako jądrowa lokalizacja cREL), prowadząca do nadekspresji cząstki adaptorowej TRAF1, jest wspólną cechą cHL i PMLBCL i może służyć jako diagnostyczny marker odróżniający te chłoniaki od chłoniaków DLBCL z 98-procentową swoistością [50–51]. Uzupełnienie tej histochemicznej sygnatury diagnostycznej o analizę aktywności czynnika transkrypcyjnego cJun może być użytecznym sche-

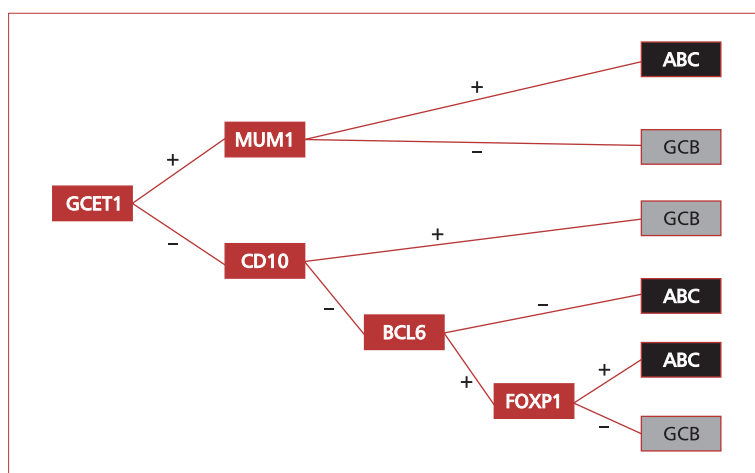
matem postępowania w wątpliwych diagnostycznie przypadkach chłoniaków „szarej strefy” [50–52]. Ta kombinacja biomarkerów, poza niewątpliwą użytecznością diagnostyczną, umożliwiła identyfikację chłoniaków, w których konstytutywna aktywność ścieżki sygnałowej prowadząca do ekspresji biomarkera może być obiektem interwencji terapeutycznej.

Standardem klasyfikacji DLBCL do kategorii ABC i GCB, uwzględnionych w klasyfikacji WHO, jest analiza z użyciem mikromacierzy i naiwnego klasyfikatora probabilistycznego Bayesa [42]. Ustalenie molekularnej charakterystyki choroby według schematu COO, poza dodatkową informacją rokowniczą, może mieć istotne znaczenie w klasyfikacji chorych do badań klinicznych, a w dalszej perspektywie — do terapii celowanymi lekami. Z oczywistych względów rutynowa analiza z użyciem wyżej wymienionego „złotego standardu” nie jest możliwa nawet u chorych leczonych w ramach badań klinicznych. Próby jego zastąpienia przez immunohistochemiczne surogaty (algorytm Hansa [48]) były nieskuteczne ze względu na niezadawalającą zgodność z wynikami uzyskanymi na podstawie naiwnego klasyfikatora probabilistycznego [41, 48]. Wraz z pojawieniem się nowych przeciwciał dla markerów ośrodków rozmnażania, walidowanych dla parafinowych skrawków diagnostycznych, możliwe stało się opracowanie rozszerzonego klasyfikatora opartego na immunohistochemicznej ocenie GCET1, CD10, BCL6, MUM1/IRF4 oraz FOXP1 (ryc. 1) [41]. Algorytm ten jest zgodny ze „złotym standardem” w 93% przypadków i zachowywał wartość

predykcyjną w zakresie całkowitego czasu przeżycia (OS, *overall survival*) oraz czasu wolnego od progresji choroby (PFS, *progression free survival*) u chorych leczonych rytuksymabem w połączeniu ze schematem cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna i prednizon (CHOP, *cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone*) (R-CHOP) [41].

Implikacje terapeutyczne wielkoskalowych badań molekularnych

Poznanie biologicznej natury molekularnych mechanizmów patogenetycznych w DLBCL i PMLBCL pozwoliło na zidentyfikowanie krytycznych dla wzrostu nowotworu szlaków transdukcji sygnału i mechanizmów immunoedycji, warunkującej wymknięcie się nowotworu spod nadzoru immunologicznego. Zatem z patogenetycznego punktu widzenia interwencja terapeutyczna przerywająca te selektywnie deregulowane szlaki może się stać leczeniem wybiórczym, potencjalnie skutecznym i dobrze tolerowanym. Na podstawie dotychczasowych badań można wskazać trzy strategie testowania, walidowania i wdrażania takich celowanych terapii: zahamowanie konstytutywnej aktywności i transdukcji sygnału wyzwalanego przez BCR, zahamowanie aktywności deregulowanych czynników transkrypcyjnych NFκB i BCL6 oraz ingerencja w interakcje komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem. Badania kliniczne dotyczące miejsca inhibicji tych mechanizmów w leczeniu DLBCL przedstawiono w tabeli 3.



Rycina 1. Różnicowanie immunohistochemiczne chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (DLBCL) z ośrodków rozmnażania (GCB) i z aktywowanych komórek B (ABC) według klasyfikacji *Cell of Origin* (COO) [41]

Figure 1. Prediction of activated B-cell (ABC) and germinal center B-cell (GCB) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) subclasses according to *Cell of Origin* (COO) classification based on immunostaining [41]

Tabela 3. Deregulowane mechanizmy sygnałowe i potencjalne cele terapeutyczne w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (DLBCL) zidentyfikowane w badaniach wielkoskalowych z użyciem mikromacierzy DNA**Table 3.** Deregulated signaling pathways and therapeutic targets identified by diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) gene expression profiling

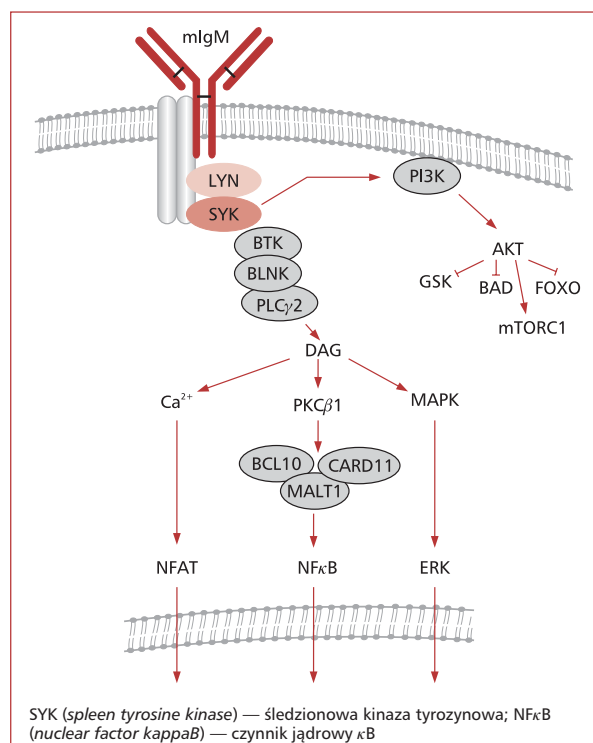
Deregulowany mechanizm sygnałowy	Typ DLBCL	Cel terapeutyczny	Inhibitor	Badania kliniczne [piśm. lub identyfikator wg www.clinicaltrials.gov]
Toniczna aktywność BCR	BCR-DLBCL	SYK PKC β 1 PI3K mTORC1	R406 Enzastauryna CAL-101 Ewerolimus	[53] [54] NCT00332202 NCT00710528 NCT00869999
NF κ B	ABC-DLBCL HR-DLBCL PMLBCL	I κ B (inhibicja degradacji proteosomalnej) MALT-1	Bortezomib Brak klinicznie dostępnego inhibitora	[55] NCT00379574, NCT00931918 (DLBCL), NCT00361621 (PMLBCL) N/A
BCL6	BCR-DLBCL GCB-DLBCL (?)	BCL6 (kompetycyjna inhibicja rekrutacji korepresorów)	Brak klinicznie dostępnego inhibitora	N/A
Interakcje z mikrośrodowiskiem	DLBCL z sygnaturą angiogenną	VEGF	Bewacizumab	[56] NCT00788606, NCT00486759, NCT00121199
	PMLBCL	PD1/PD-L2	CT-010	[57]

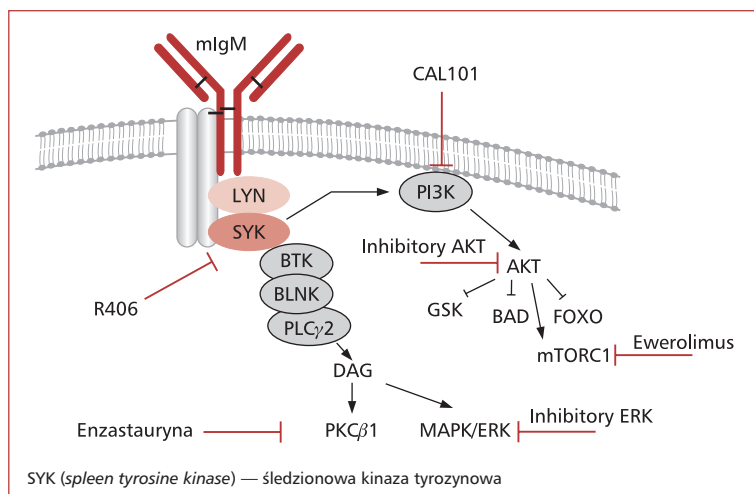
SYK (*spleen tyrosine kinase*) — śledzionowa kinaza tyrozynowa; BCR (*B-cell receptor*) — receptor B-komórkowy; PMLBCL (*primary mediastinal large B-cell lymphoma*) — pierwotny chłoniak śródpiersia z dużych komórek B; ABC (*activated B-cell*) — aktywowane komórki B; NF κ B (*nuclear factor kappaB*) — czynnik jądrowy κ B; GCB (*germinal center B-cell*) — komórki B z ośrodków rozmnażania; VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródblonka naczyniowego

Inhibicja tonicznego sygnału z BCR

Toniczny sygnał BCR jest istotnym czynnikiem warunkującym różnicowanie i przetrwanie obwodowych limfocytów B i komórek chłoniaków DLBCL typu „BCR”. Sygnał z BCR jest przekazywany za pośrednictwem SYK w kierunku trzech podstawowych szlaków sygnałowych: zależnej od PKC β 1 aktywacji kompleksu CBM i NF κ B, zależnej od kinazy BTK aktywacji PI3K i AKT oraz aktywacji kaskady kinaz MAP [58–59] (ryc. 2). W tej kaskadzie SYK stanowi najbardziej proksymalną do BCR kinazę odpowiedzialną za transdukcję oraz amplifikację sygnału i stanowi racjonalny cel interwencji terapeutycznej [59]. Zastosowanie wysokospecyficznego, ATP-kompetycyjnego inhibitora SYK (R406, fostamatinib) *in vitro* powodowało zahamowanie tonicznej i aktywowanej ligandem aktywności BCR i prowadziło do apoptozy badanych komórek. W badaniu klinicznym I/II fazy u chorych z nawrotowymi/pierwotnie opornymi DLBCL leczonymi fostamatinibem, stosowanym w monoterapii, obserwowano dobrą tolerancję tego leku i odpowiedź w 22% (5/23) przypadków, a stabilizację choroby u dalszych 17% (4/23) chorych (tab. 3) [53].

Jednym z kluczowych dystalnych szlaków aktywowanych przez SYK jest szlak kinazy PKC β 1.

**Rycina 2.** Kaskady przekazywania sygnału z receptora B-komórkowego (BCR)**Figure 2.** B-cell receptor (BCR) signal transduction cascade



Rycina 3. Ścieżki sygnałowe wyzwalane przez receptor B-komórkowy (BCR) i potencjalne miejsca terapii celowanej
Figure 3. Signaling pathways triggered by B-cell receptor (BCR) and potential therapeutic targets

Nadekspresja tej kinazy to negatywny czynnik rokowniczy u chorych z DLBCL, co może sugerować jej istotne znaczenie patogenetyczne. Selektywny inhibitor PKC β 1 — enzastaurynę stosowano w monoterapii u chorych z nawrotowymi i opornymi na leczenie DLBCL w I/II fazie badań [54]. U 12/55 (22%) pacjentów obserwowano brak progresji choroby przez okres 2 cykli terapii, u dalszych 8 chorych — przez okres 4 lub więcej cykli, a u 4 chorych — długotrwałą remisję (32–64 miesięcy) [54]. Te obiecujące wyniki stały się podstawą do rozpoczęcia wieloośrodkowego badania klinicznego III fazy służącego ocenie roli enzastauryny w terapii podtrzymującej u chorych z DLBCL, którzy zakończyli leczenie według schematu R-CHOP (PRELUDE, *Prevention of Relapse in Lymphoma Using Daily Enzastaurin*) (tab. 3).

Drugim ramieniem sygnału BCR jest aktywacja kinaz BTK, PI3K i AKT. Ramie to wydaje się szczególnie istotne, ponieważ u myszy z wyłączoną na etapie limfocyta germinalnego ekspresją BCR, u których dochodzi do delecji dojrzałych komórek B, wymuszenie ekspresji aktywnej formy PI3K spowodowało przetrwanie komórek B [60]. Obserwacje te mogą sugerować, że terapeutyczna inhibicja tego ramienia może wykazywać synergistyczny efekt z inhibicją SYK i PKC β 1. Swoisty inhibitor PI3K CAL-101 jest dostępny klinicznie i obecnie testowany w I fazie badań u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową i chłoniakami nieziarniczymi (tab. 3).

Rozgałęzienie sygnału BCR ma istotne implikacje biologiczne i terapeutyczne w DLBCL, ponie-

waż w sytuacji wyłączenia proksymalnych elementów kaskady transdukcji sygnału elementy dystalne mogą kompensacyjnie przejąć część funkcji brakującego ogniwa. Skojarzona inhibicja tych krytycznych szlaków sygnałowych może być zatem bardziej skuteczna terapeutycznie (ryc. 3).

Inhibicja aktywności NF κ B i BCL6

Konstitutywna aktywacja NF κ B w wyniku oddziaływania egzogennych czynników wydzielanych przez mikrośrodowisko lub endogennych mechanizmów genetycznych, prowadzących do aktywacji tej ścieżki sygnałowej poprzez kompleks CBM, w części chłoniaków DLBCL jest ważnym mechanizmem antyapoptotycznym, wzrostowym i zwiększającym oporność komórek na chemioterapię [16, 18, 36, 39, 61]. Wprowadzenie do komórek zmutowanej, niepoddającej się fizjologicznej regulacji formy I κ B α (*super-represor I κ B*) prowadzi selektywnie do ograniczenia ekspresji genów regulowanych przez NF κ B i apoptozy linii komórkowych DLBCL z konstytutywną aktywnością tego czynnika transkrypcyjnego oraz linii PMLBCL [18, 36]. Podobne wyniki obserwowano w przypadku użyciu małowiązących inhibitorów I κ B [62]. Ponieważ NF κ B zwiększa oporność komórek na chemioterapię [61], obserwacje te mogą sugerować, że inhibicja NF κ B może być terapeutycznie korzystna zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z chemioterapią. Dostępną klinicznie strategią inhibicji NF κ B jest zastosowanie inhibitora proteasomu (bortezomibu), który niespecyficznie hamuje degradację I κ B α/ϵ i prowadzi do cytoplazmatycznej sekwestracji i inaktywacji NF κ B [63].

W pilotażowych badaniach w małej grupie chorych z nawrotem DLBCL zastosowanie bortezomibu w skojarzeniu z chemioterapią było skuteczniejsze w ABC-DLBCL niż w GCB-DLBCL [55]. Badanie to wskazuje, że taka kombinacja może poprawić wyniki leczenia w tej molekularnie zdefiniowanej grupie chorych o gorszym rokowaniu oraz otwiera drogę do dalszych badań nad miejscem inhibitorów NF κ B w leczeniu DLBCL. Z praktycznego punktu widzenia wydaje się również, że użycie jądrowej lokalizacji NF κ B jako immunohistochemicznego markera aktywności tego czynnika, identyfikującego chorych, którzy mogą być kandydatami do takiego leczenia, jest strategią prostszą i bardziej precyzyjną. Ponadto, ze względu na mało specyficzny charakter działania bortezomibu, dalsze badania powinny zostać przeprowadzone z użyciem bardziej swoistych inhibitorów tego czynnika transkrypcyjnego. Obiecującym celem terapeutycznym może być sam deregulowany kompleks CBM. Inhibicja wchodzącej w skład kompleksu parakaspazy MALT-1 prowadzi do zahamowania proteolizy jej substratów, ograniczenia aktywności NF κ B i apoptozy linii komórkowych DLBCL typu ABC [38, 64]. Ponieważ myszy ze zknokautowanym genem *Malt-1* są żywotne i wykazują tylko niewielkie zaburzenia immunologiczne, niskocząsteczkowe inhibitory MALT-1 mogą się stać leczeniem dobrze tolerowanym i znacznie bardziej swoistym niż bortezomib [65]. Inhibicja NF κ B może również korzystnie wpływać na wyniki leczenia PMLBCL charakteryzujących się konstytutywną aktywnością tego czynnika transkrypcyjnego [18, 21–22].

Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, którego konstytutywna aktywność w znacznym stopniu warunkuje fenotyp komórek nowotworowych w części DLBCL, jest BCL6 [47]. Chłoniaki DLBCL, zależne od szlaków molekularnych regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny, wykazują skoordynowany profil ekspresji genów kontrolowanych przez BCL6, odrębny od profilu chłoniaków niezależnych od BCL6 [47, 66]. Do swej funkcji represora transkrypcji BCL6 wymaga korepresorów BCoR, NCoR oraz SMRT, zatem rozerwanie tej interakcji za pomocą peptydu BPI (*BCL6 peptide inhibitor*) wyłącza funkcję BCL6 [67–68]. W badaniach *in vitro* BPI powodował zahamowanie proliferacji i apoptozę w liniach komórkowych DLBCL o charakterystyce molekularnej „BCR” [47, 67]. Podobny efekt obserwowano w badaniach *in vivo* z użyciem ludzkich DLBCL ksenotransplantowanych immunniekompetentnym myszom [67]. Peptyd BPI, ze względu na swój niski stopień helikalności i stabilności w roztworach, wymaga wysokich stężeń, co nie

wyklucza stosowania go jako związku „narzędziowego” w celu udokumentowania hipotezy, lecz wyklucza jego zastosowanie w terapii. Tych wad może być pozbawiony peptyd inhibitorowy sztucznie stabilizowany „klamrą” węglowodorową obejmującą jeden skok helisy (*hydrocarbon-stapled peptide*) [69].

Inhibicja interakcji komórek chłoniakowych z mikrośrodowiskiem

Obrazy histopatologiczne DLBCL i PMLBCL oraz ich mikroarchitektonika są wynikiem złożonych, dwustronnych oddziaływań między komórkami nowotworowymi i podścieliskiem [70]. Oddziaływania te odzwierciedlają procesy zapalne, włóknienia i angiogenezy zachodzące w obrębie guza. W DLBCL obecność nacieków komórkowych odzwierciedlających procesy neoangiogenetyczne, wyrażona poprzez nadekspresję między innymi markerów komórek śródbłonna, czynników adhezyjnych i proangiogennych (w tym czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego [VEGF, *vascular endothelial growth factor*]) wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie według schematu R-CHOP [44]. Obecność tej molekularnej sygnatury korelowała z histologiczną gęstością mikronaczyń w obrębie tkanki nowotworowej [44]. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego, poza funkcją proangiogenną, wykazuje również działanie wzrostowe dla samych komórek chłoniakowych w mechanizmach parai endokrynnym [71], zatem inhibicja osi VEGF–VEGF-R może być racjonalną terapią u części chorych z DLBCL wykazującymi intensywne cechy neoangiogenezy. Wstępne wyniki badań na modelach zwierzęcych, guzach litych oraz pilotażowych badaniach klinicznych u chorych z DLBCL wskazują na lepsze wyniki zastosowania przeciwciał monoklonalnych neutralizujących VEGF (bewacizumab) w skojarzeniu z chemioterapią niż w monoterapii [56, 72]. Trwają badania II i III fazy u chorych z DLBCL z użyciem tego przeciwciała w skojarzeniu z chemioterapią (tab. 3).

Inny aspekt patogenetyczny mikrośrodowiska to jego rola w procesach zapalnych wywołanych obecnością nowotworu. Przeciwnowotworowa odpowiedź zapalna może prowadzić do immunoedycji, czyli ewolucji klonalnej komórek nowotworowych i wzrostu tych spośród nich, które wykształciły skuteczne mechanizmy uniknięcia mechanizmów nadzoru immunologicznego. Jednym z takich mechanizmów jest ekspresja białka PD-L2 w chłoniakach PMLBCL [21]. Mechanizm ten nie jest specyficzny wyłącznie dla PMLBCL i występuje w innych nowotworach, w których inhibicja interakcji T-komór-

kowego receptora PD-1 z jego ligandami za pomocą przeciwciał monoklonalnych może przywracać skuteczną odpowiedź immunologiczną [23, 73–75]. W I fazie badań klinicznych u chorych na nowotwory układu krwiotwórczego i chłonnego przeciwciało CT-011 neutralizujące PD-1 było leczeniem bezpiecznym i dobrze tolerowanym [57]. Kolejne fazy badań, z użyciem przeciwciał neutralizujących zarówno receptor PD-1, jak i jego ligandy u chorych na PMLBCL i HL są w trakcie przygotowań.

Podsumowanie

Dzięki rozwojowi technologii biologii systemowej i metod analizy wielkoskalowych eksperymentów genetycznych w ostatnich latach dokonał się istotny postęp w poznaniu charakterystyki transkrypcyjnej chłoniaków DLBCL i PMLBCL. Wstępnie scharakteryzowano wewnętrzną heterogenność molekularną chorób o identycznym lub prawie identycznym obrazie histopatologicznym. Odkrycia te przyniosły korzyści w postaci klinicznie użytecznych algorytmów diagnostycznych, które pozwalają na uszczegółowienie diagnostyki tych chorób i mogą wnieść dodatkowe informacje rokownicze. Największą i najbardziej obiecującą zdobyczą wydaje się jednak scharakteryzowanie niektórych mechanizmów patogenetycznych warunkujących wzrost nowotworu, które mogą się stać obiektem interwencji terapeutycznych.

Mikromacierze DNA nie są jednak „szklaną kulą”, w której biolodzy i klinicyści ujrzą odpowiedzi na wszystkie pytania dotyczące patogenezy tych chorób. Istniejące molekularne „klasyfikacje” DLBCL nie są w pełni precyzyjne i nie oddają w całości molekularnej heterogenności tych schorzeń. Te ograniczenia są w pełni zrozumiałe, zważywszy, że mikromacierze DNA pozwalają wyłącznie na analizę zmienności transkryptomu. Głębsze zrozumienie tego, co się naprawdę dzieje w komórkach nowotworowych i odpowiada za ich fenotyp, będzie bardziej prawdopodobne dzięki platformom wielkoskalowym do oceny integralności genomu (mikromacierze SNP), ekspresji mikroRNA, metabolomiki, struktury proteomicznej, „kinomiki” (stanu fosforylacji białek) i sekwencji całego genomu komórek nowotworowych, a zwłaszcza ich zintegrowanej analizie uwzględniającej interakcje między badanymi zjawiskami. Co więcej, technologie te stwarzają uzasadnione nadzieje, że poznanie działania tych wyjątkowo skomplikowanych systemów pozwoli na skuteczne ich wykorzystanie w celach terapeutycznych.

Piśmiennictwo

1. Kupperts R., Klein U., Hansmann M.L., Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 1520–1529.
2. Klein U., Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 22–33.
3. Kupperts R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 251–262.
4. Monti S., Savage K.J., Kutok J.L. i wsp. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005; 105: 1851–1861.
5. Weiss L.M., Warnke R.A., Sklar J., Cleary M.L. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 1185–1189.
6. Ladanyi M., Offit K., Jhanwar S.C., Filippa D.A., Chaganti R.S. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood* 1991; 77: 1057–1063.
7. Kramer M.H., Hermans J., Wijburg E. i wsp. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3152–3162.
8. Muschen M., Rajewsky K., Kronke M., Kupperts R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol.* 2002; 23: 75–80.
9. Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T. i wsp. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412: 341–346.
10. Bea S., Colomo L., Lopez-Guillermo A. i wsp. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 3498–3506.
11. Gronbaek K., Worm J., Ralfkiaer E., Ahrenkiel V., Hokland P., Guldberg P. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002; 100: 1430–1437.
12. Lenz G., Wright G.W., Emre N.C. i wsp. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 13520–13525.
13. Lenz G., Nagel I., Siebert R. i wsp. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 633–643.
14. Wlodarska I., Veyt E., De Paepe P. i wsp. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. *Leukemia* 2005; 19: 1299–1305.
15. Pasqualucci L., Compagno M., Houldsworth J. i wsp. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 311–317.
16. Lenz G., Davis R.E., Ngo V.N. i wsp. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B-cell lymphoma. *Science* 2008; 319: 1676–1679.
17. Compagno M., Lim W.K., Grunn A. i wsp. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; 459: 717–721.
18. Feuerhake F., Kutok J.L., Monti S. i wsp. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 2005; 106: 1392–1399.

19. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 987–994.
20. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. i wsp. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–511.
21. Rosenwald A., Wright G., Leroy K. i wsp. Molecular diagnosis of primary mediastinal B-cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B-cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 851–862.
22. Savage K.J., Monti S., Kutok J.L. i wsp. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102: 3871–3879.
23. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 2008; 26: 677–704.
24. Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 239–245.
25. Barth T.F., Leithauser F., Joos S., Bentz M., Moller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncol.* 2002; 3: 229–234.
26. Isaacson P.G., Norton A.J., Addis B.J. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* 1987; 2: 1488–1491.
27. Courts C., Montesinos-Rongen M., Brunn A. i wsp. Recurrent inactivation of the PRDM1 gene in primary central nervous system lymphoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67: 720–727.
28. Montesinos-Rongen M., Kuppers R., Schluter D. i wsp. Primary central nervous system lymphomas are derived from germinal-center B cells and show a preferential usage of the V4-34 gene segment. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 2077–2086.
29. Montesinos-Rongen M., Brunn A., Bentink S. i wsp. Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B-cell. *Leukemia* 2008; 22: 400–405.
30. Tun H.W., Personett D., Baskerville K.A. i wsp. Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood* 2008; 111: 3200–3210.
31. Rubenstein J.L., Fridlyand J., Shen A. i wsp. Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. *Blood* 2006; 107: 3716–3723.
32. Booman M., Szuhai K., Rosenwald A. i wsp. Genomic alterations and gene expression in primary diffuse large B-cell lymphomas of immune-privileged sites: the importance of apoptosis and immunomodulatory pathways. *J. Pathol.* 2008; 216: 209–217.
33. Jordanova E.S., Riemersma S.A., Philippo K., Giphart-Gassler M., Schuurin E., Kluin P.M. Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 38–48.
34. Rosenwald A., Wright G., Chan W.C. i wsp. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1937–1947.
35. Lossos I.S., Alizadeh A.A., Eisen M.B. i wsp. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B-cell-like but not in activated B-cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 10209–10213.
36. Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U., Staudt L.M. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1861–1874.
37. Jost P.J., Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109: 2700–2707.
38. Bidere N., Ngo V.N., Lee J. i wsp. Casein kinase Ialpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature* 2009; 458: 92–96.
39. Ngo V.N., Davis R.E., Lamy L. i wsp. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 2006; 441: 106–110.
40. Fu K., Weisenburger D.D., Choi W.W. i wsp. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 4587–4594.
41. Choi W.W., Weisenburger D.D., Greiner T.C. i wsp. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 5494–5502.
42. Wright G., Tan B., Rosenwald A., Hurt E.H., Wiestner A., Staudt L.M. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 9991–9996.
43. Abramson J.S., Shipp M.A. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood* 2005; 106: 1164–1174.
44. Lenz G., Wright G., Dave S.S. i wsp. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 2313–2323.
45. Takahashi H., Feuerhake F., Kutok J.L. i wsp. FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 3265–3271.
46. Chen L., Monti S., Juszczynski P. i wsp. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008; 111: 2230–2237.
47. Polo J.M., Juszczynski P., Monti S. i wsp. Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 3207–3212.
48. Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C. i wsp. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275–282.
49. Poulsen C.B., Borup R., Nielsen F.C. i wsp. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 2005; 74: 453–465.
50. Rodig S.J., Savage K.J., LaCasce A.S. i wsp. Expression of TRAF1 and nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2007; 31: 106–112.
51. Rodig S.J., Savage K.J., Nguyen V. i wsp. TRAF1 expression and c-Rel activation are useful adjuncts in distinguishing classical Hodgkin lymphoma from a subset of morphologically or immunophenotypically similar lymphomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2005; 29: 196–203.
52. Rodig S.J., Ouyang J., Juszczynski P. i wsp. AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 3338–3344.

53. Friedberg J.W., Sharman J., Schaefer-Cutillo J. i wsp. Fostamatinib disodium (FosD), an oral inhibitor of syk, is well-tolerated and has significant clinical activity in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and chronic lymphocytic leukemia (SLL//CLL). Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2008; 112: 3 [abstrakt].
54. Robertson M.J., Kahl B.S., Vose J.M. i wsp. Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. J. Clin. Oncol. 2007; 25: 1741–1746.
55. Dunleavy K., Pittaluga S., Czuczman M.S. i wsp. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2009; 113: 6069–6076.
56. Stopeck A.T., Unger J.M., Rimsza L.M. i wsp. A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: southwest oncology group study S0108. Leuk. Lymphoma 2009; 50: 728–735.
57. Berger R., Rotem-Yehudar R., Slama G. i wsp. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. Clin. Cancer Res. 2008; 14: 3044–3051.
58. Dal Porto J.M., Gauld S.B., Merrell K.T., Mills D., Pugh-Bernard A.E., Cambier J. B-cell antigen receptor signaling 101. Mol. Immunol. 2004; 41: 599–613.
59. Monroe J.G. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. Nat. Rev. Immunol. 2006; 6: 283–294.
60. Srinivasan L., Sasaki Y., Calado D.P. i wsp. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B-cell survival. Cell 2009; 139: 573–586.
61. Baldwin A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. J. Clin. Invest. 2001; 107: 241–246.
62. Lam L.T., Davis R.E., Pierce J. i wsp. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 28–40.
63. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. Nat. Rev. Cancer 2004; 4: 349–360.
64. Ferch U., Kloos B., Gewies A. i wsp. Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. J. Exp. Med. 2009; 206: 2313–2320.
65. Ruefli-Brasse A.A., French D.M., Dixit V.M. Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. Science 2003; 302: 1581–1584.
66. Ci W., Polo J.M., Cerchiatti L. i wsp. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. Blood 2009; 113: 5536–5548.
67. Cerchiatti L.C., Yang S.N., Shakhovich R. i wsp. A peptomimetic inhibitor of BCL6 with potent antilymphoma effects in vitro and in vivo. Blood 2009; 113: 3397–3405.
68. Polo J.M., Dell’Oso T., Ranuncolo S.M. i wsp. Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. Nat. Med. 2004; 10: 1329–1335.
69. Walensky L.D., Kung A.L., Escher I. i wsp. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. Science 2004; 305: 1466–1470.
70. Juszczyński P., Nowak J., Warzocha K. Host immune response in B-cell lymphomas: friend or foe? Arch. Immunol. Ther. Exp. 2008; 56: 245–255.
71. Wang E.S., Teruya-Feldstein J., Wu Y., Zhu Z., Hicklin D.J., Moore M.A. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. Blood 2004; 104: 2893–2902.
72. Hurwitz H.I., Fehrenbacher L., Hainsworth J.D. i wsp. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 3502–3508.
73. Blank C., Brown I., Peterson A.C. i wsp. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T-cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T-cells. Cancer Res. 2004; 64: 1140–1145.
74. Chemnitz J.M., Eggle D., Driesen J. i wsp. RNA fingerprints provide direct evidence for the inhibitory role of TGFbeta and PD-1 on CD4+ T-cells in Hodgkin lymphoma. Blood 2007; 110: 3226–3233.
75. Yamamoto R., Nishikori M., Kitawaki T. i wsp. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. Blood 2008; 111: 3220–3224.