

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԿՈՏԼՈՎ ՆԻԿԻՏԱ ՅՈՒՐԻԻ

ԴԻՖՈՒԶ ԽՈՇՈՐ ԲՋՋԱՅԻՆ ԼԻՄՖՈՄԱՅԻ ՄԻԿՐՈՄԻՋԱՎԱՅՐԻ
ԵՆԹԱՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԴԱՍԱԿԱՐԳՈՒՄ ԵՎ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ ՏՐԱՆՍԿՐԻՊՏՈՄԱՅԻՆ ՏՎՅԱԼՆԵՐԻ ՀԻՄԱՆ ՎՐԱ

Գ.00.03. – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2025

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

КОТЛОВ НИКИТА ЮРЬЕВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ПОДТИПОВ
МИКРООКРУЖЕНИЯ ДИФУЗНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ НА ОСНОВЕ
ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.03 - «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН – 2025

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝

Կ.գ.թ. Բազան Ալեքսանդր Վլադիսլավի

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.գ.դ. Նազարյան Կարեն Բաբկենի

Կ.գ.թ. Մանուկյան Գայանե Փաշիկի

Առաջատար կազմակերպություն՝


Հայ-Ռուսական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2025 թ. նոյեմբերի 20-ին, ժամը
14:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042
մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ 0014, ք. Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գրադարանում և <https://imb.am/> կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2025 թ. հոկտեմբերի 20-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու



Ռ.Վ. Չախարյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Институт молекулярной
биологии НАН РА.

Научный руководитель:

к.б.н. Багаев Александр Владиславович

Официальные оппоненты:

д.б.н. Назарян Карен Бабкенович

к.б.н. Манукян Гаянэ Пашиковна

Ведущая организация:

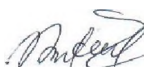
Российско-Армянский университет

Защита диссертации состоится 20 ноября 2025 г. в 14:00, на заседании специализированного
совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна
7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН
РА и на сайте <https://imb.am/>.

Автореферат диссертации разослан 20 октября 2025 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042
кандидат биол. наук.



Захарян Р.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка задачи. Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) является наиболее распространенной формой агрессивных неходжкинских лимфом, составляя до 40% всех случаев. Ежегодно в США диагностируется около 18–20 тысяч новых пациентов, медианный возраст постановки диагноза превышает 65 лет. Заболевание отличается выраженной клинико-биологической гетерогенностью: оно включает спектр морфологических и молекулярных фенотипов, объединяемых в рамках единого диагноза как диагноз исключения [Li et al., 2018].

Стандарт первой линии терапии (R-CHOP) позволяет достичь излечения примерно у 60–65% больных, однако треть пациентов не отвечает на лечение или быстро рецидивирует, что указывает на необходимость разработки более точных прогностических и стратификационных подходов [Nowicka et al. 2021; Tilly et al., 2022; Shune et al., 2025].

Одним из ключевых направлений изучения DLBCL стало транскриптомное профилирование, которое позволило выделить два основных подтипа по клетке происхождения (COO): GCB (germinal center B-cell-like) и ABC (activated B-cell-like). Они отличаются не только экспрессионными профилями, но и прогнозом, а также молекулярными механизмами лимфомогенеза. Тем не менее, даже в пределах этих групп сохраняется значительная гетерогенность [Alizadeh et al., 2000; Wright et al., 2003].

К числу факторов, определяющих клинический исход, относятся транслокации генов BCL2, BCL6 и MYC, а также агрессивные варианты, такие как double-hit и triple-hit лимфомы, лимфомы с двойной экспрессией MYC и BCL2 (DEL), и другие молекулярные подтипы (например, MNG, DNTsig-положительные). Их выделение имеет непосредственное прогностическое и терапевтическое значение [Sha et al., 2019; Ennishi et al., 2019; Mehta et al., 2020].

Наряду с характеристикой опухолевых клеток все большее внимание привлекает микроокружение лимфомы (LME). Работы последних двух десятилетий показали, что состав и функциональное состояние Т- и В-клеток, макрофагов, фибробластов и элементов внеклеточного матрикса существенно влияют на рост опухоли и ответ на терапию. Иммунная инфильтрация может как поддерживать противоопухолевый контроль, так и способствовать иммунной супрессии. Особую роль играют Т-хелперы, Т-киллеры, макрофаги и стромальные клетки, формирующие характерные сигнатуры экспрессии, связанные с прогнозом [Mintz and Cyster, 2020; Ishii et al., 2023; Zhan et al., 2023; Liongue et al., 2024].

Эпигенетические механизмы также занимают важное место в патогенезе DLBCL. Нарушения метилирования ДНК, репрограммирование хроматина и инактивация супрессоров опухолей через эпигенетическое подавление сопровождают прогрессию болезни и формирование устойчивости к терапии. Отдельное значение имеет гиперметилирование регуляторных генов, включая элементы сигнального пути TGFβ [Zhang et al., 2013; Subbarayan et al., 2018; Stelling et al., 2019].

Таким образом, DLBCL представляет собой болезнь со сложной иерархией генетических, транскриптомных, иммунных и эпигенетических изменений. Современные подходы требуют интеграции информации о клетке происхождения, молекулярных нарушениях и состоянии микроокружения. Это обосновывает актуальность исследования биологических подтипов DLBCL с учетом экспрессионных профилей и характеристик LME для разработки новых систем стратификации пациентов и поиска терапевтических мишеней.

Цель и задачи работы

Цель диссертационной работы: разработка молекулярной классификации подтипов опухолевого микроокружения в диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме, исследование их биологических свойств, клинической значимости и взаимодействия с генетическим контекстом опухоли.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и верифицировать классификацию подтипов опухолевого микроокружения (LME) на основе транскриптомных данных.
2. Исследовать ассоциации подтипов LME с клинико-патологическими и молекулярными характеристиками DLBCL, включая известные экспрессионные классификации.
3. Оценить прогностическую значимость LME-подтипов на независимых когортах, включая данные клинических испытаний с различными режимами терапии.
4. Проверить функциональную роль LME-подтипов в доклинических моделях.
5. Провести характеристику подтипов микроокружения и генетических подтипов DLBCL и их связь с структурными особенностями В-клеточного рецептора лимфомы (изотип, сегмент IGHV).
6. Интегрировать данные о микроокружении и мутационном профиле для выявления новых биологически значимых и клинически релевантных подтипов DLBCL.

Научная новизна. Работа вносит вклад в понимание молекулярной и клинической гетерогенности диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы. Предложенная транскриптомная классификация подтипов опухолевого микроокружения (LME) отражает воспроизводимые биологические состояния, связанные с иммунной активностью, эпигенетическим статусом и стромальной архитектурой опухоли.

Показано, что подтипы LME обладают прогностической и потенциальной предиктивной значимостью, в том числе в контексте терапии обинутумабом, и уже используются как биомаркеры в клинических исследованиях. Иммуносупрессивный подтип LME-DP характеризуется обратимым эпигенетическим подавлением и может быть функционально перепрограммирован с помощью деметилирующих агентов, например, азацитидина, что подтверждает возможность терапевтически корректировать микроокружение лимфом.

Выявленные ассоциации между структурой В-клеточного рецептора, мутационным профилем и подтипами микроокружения позволяют более точно реконструировать происхождение и эволюцию опухоли, а также определять группы пациентов с высоким риском неблагоприятного исхода.

Практическая ценность работы заключается в создании интегративной модели, объединяющей транскриптомные, генетические и эпигенетические данные, что открывает возможности для стратификации больных, прогнозирования ответа на терапию и разработки новых схем лечения, основанных на функциональной ре-программируемости опухолевого микроокружения.

Апробация результатов исследования. Основные результаты исследования докладывались и обсуждались на международных конференциях по онкогематологии, молекулярной биологии и биоинформатике. Включая устные доклады на ASH 2019 (622.Lymphoma Biology-Non-Genetic Studies| November 13, 2019) <https://doi.org/10.1182/blood-2019-128889>, Ash 2023 <https://doi.org/10.1182/blood-2023-182390>. Отдельные фрагменты исследования представлены в публикациях в рецензируемых журналах с высоким индексом цитирования, включая Cancer Cell, Cancer Discovery, Journal of Experimental Medicine и Clinical Cancer Research. Результаты также были представлены на заседаниях Ученого совета Института молекулярной биологии РАН.

Полученные данные использовались при разработке совместных проектов с ведущими исследовательскими центрами (Weill Cornell Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, National Cancer Institute) и фармацевтическими компаниями. Классификация подтипов микроокружения DLBCL включена в качестве вторичной конечной точки в современные клинические испытания (GUIDANCE-01, NCT054648234), что подтверждает ее практическую значимость и востребованность.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 59 оригинальных рисунков и 2 таблицы. Список литературы включает 141 библиографическую ссылку.

Публикации. Основные результаты диссертации отражены в 6 научных публикациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование когорт. Для исследования был проведен систематический поиск и отбор данных в международных публичных базах (GEO, ArrayExpress, SRA, ENA). В итоговую мета-когарту вошло более 5000 экспрессионных профилей опухолевых и нормальных лимфоидных тканей, включая свыше 4500 случаев DLBCL. Дополнительно в анализ включались образцы фолликулярной (FL) и буркиттской лимфомы (BL), что позволило расширить спектр сравнения и уточнить границы между лимфомными подтипами. Такой масштабный пул данных обеспечил статистическую устойчивость полученных результатов и позволил выделять воспроизводимые закономерности.

Сигнатуры клеточных популяций. Для оценки вклада различных типов клеток микроокружения был собран референсный компендиум более чем из 5000 RNA-seq профилей очищенных клеточных популяций. Он включал как опухолевые, так и нормальные В-клетки, различные подтипы Т-лимфоцитов, макрофаги, фибробласты и другие элементы микроокружения. Использование этого компендиума позволило построить надежные экспрессионные сигнатуры, описывающие клеточный состав и функциональные состояния, включая воспалительные и иммуносупрессивные фенотипы.

Классификация клеточного происхождения и микроокружения. Для определения клеточного происхождения (COO) использовались как классические модели (GCB и ABC), так и расширенные алгоритмы для выделения DNTsig-положительных подтипов. Для описания микроокружения применялись методы деконволюции транскриптомных профилей, что позволило количественно оценить представительство иммунных и стромальных компонентов в опухолях. Такая интеграция дала возможность описывать не только саму опухолевую клетку, но и её взаимодействие с окружающими иммунными и стромальными элементами.

Эпигенетический анализ. Для исследования роли эпигенетических механизмов применялся метод сокращенного представления бисульфитного секвенирования (eRRBS). На основе полученных данных рассчитывался индекс CIMP, отражающий степень гиперметилирования генома, и подробно анализировался промоторный регион гена SMAD1. Такой подход позволил выявить эпигенетические различия между подтипами и установить их связь с формированием иммуносупрессивного фенотипа.

Генетический анализ и реконструкция BCR. Изучение мутационного профиля проводилось на основе данных полноэкзомного (WES), полногеномного (WGS) и транскриптомного (RNA-seq) секвенирования. Особое внимание уделялось реконструкции В-клеточного рецептора (BCR), которая позволила оценить закономерности использования сегментов IGHV и распределение изотипов иммуноглобулинов. Эти данные отражают не только эволюцию опухолевого клона, но и механизмы активации В-клеток, что имеет значение для понимания патогенеза DLBCL.

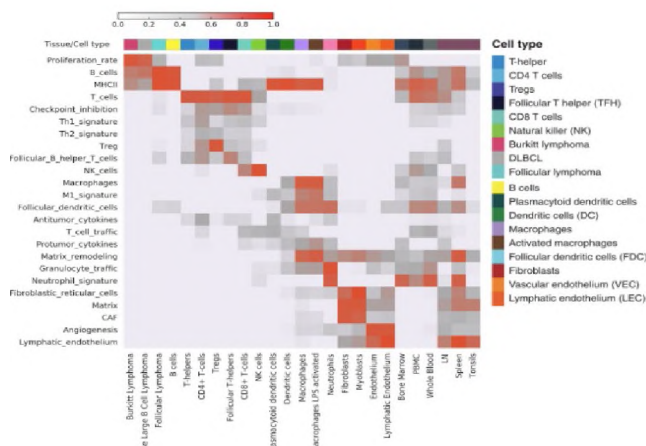
Исследование внеклеточного матрикса. Для анализа роли структурных компонентов опухолевого микроокружения была собрана база данных внеклеточного матрикса (matrisome), дополненная результатами протеомных и транскриптомных исследований. Рассматривалась функциональная роль таких молекул, как декорин и бигликан, участвующих в регуляции межклеточных взаимодействий и сигналинга. Это позволило

связать экспрессию матричных компонентов с клиническим прогнозом и иммунным фенотипом опухолей.

Иммуногистохимия. Иммуногистохимическое окрашивание применялось для верификации полученных биоинформатических предсказаний. В частности, оценивалось распределение клеточных популяций и уровень экспрессии ключевых белков, включая маркеры иммунной активации и супрессии. Это обеспечивало независимое подтверждение транскриптомных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для описания клеточного состава микроокружения лимфоузлов при DLBCL был создан набор из 276 генов, сгруппированных в 22 функциональные сигнатуры, отражающие основные популяции иммунных и стромальных клеток (Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, макрофаги, фибробласты, FDC, FRC) и ключевые биологические процессы, включая ремоделирование внеклеточного матрикса и пролиферативную активность. Сигнатуры были сформированы на основании анализа более 300 публикаций и адаптированы для расчета методом ssGSEA, что позволило количественно оценить вклад отдельных клеточных



На основе рассчитанных сигнатур был выполнен анализ более 5000 транскриптомов лимфом из объединенной мета-когорты, включающей 4655 случаев DLBCL и дополнительные образцы FL и BL. После нормализации данных и устранения батч-эффектов проведена кластеризация методом Louvain, позволившая выделить четыре устойчивых подтипа опухолевого микроокружения (LME): LME-GC (похожий на герминативный центр, 15%), LME-MS (мезенхимальный, 33%), LME-IN (воспалительный, 25%) и LME-DE (обедненный, 27%). Каждый из подтипов характеризовался уникальным набором клеточных и функциональных сигнатур. LME-GC демонстрировал признаки организации герминативного центра и высокий уровень Tfh и FDC; LME-MS — активное ремоделирование матрикса и стромальную перестройку; LME-IN — воспалительную инфильтрацию с преобладанием CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток; LME-DE — обеднение как иммунных, так и стромальных элементов и признаки эпигенетического подавления. Распределение подтипов было равномерным между различными когортами и платформами, что подтверждает их биологическую устойчивость (Рисунки 2-3).

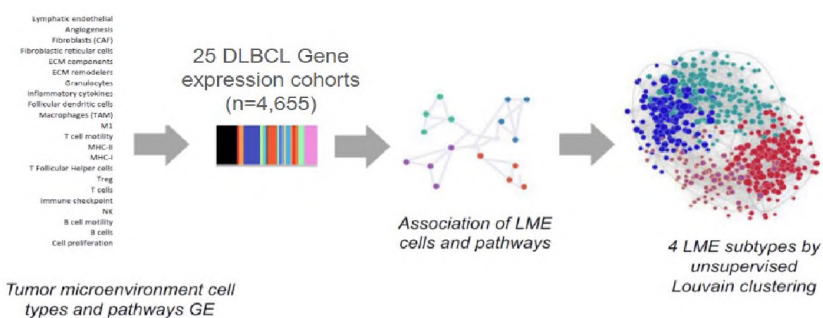


Рисунок 2. Схема получения подтипов.

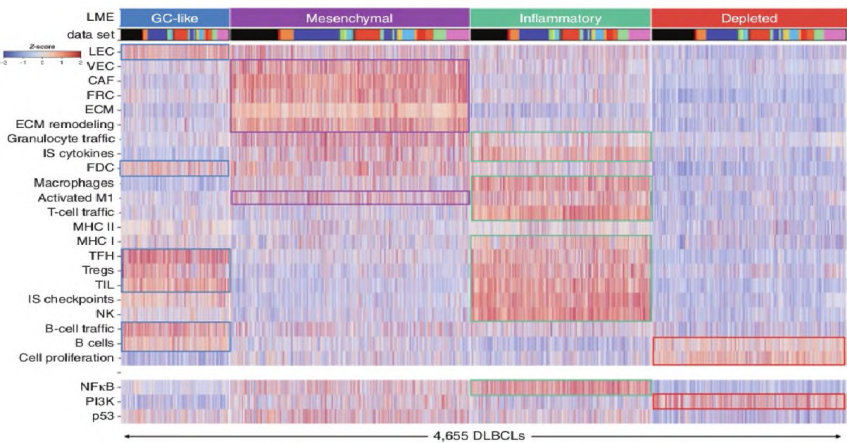


Рисунок 3. Тепловая карта 4655 образцов DLBCL в пространстве сигнатур. Легенды показывают кластер и когорту. На тепловой карте отражены нормализованные значения сигнатур для каждого образца в диапазоне от -2 (синий цвет) до 2 (красный цвет). Прямоугольниками выделены некоторые определяющие свойства соответствующих кластеров.

Характеризация подтипов

Первый подтип был назван LME-GC. Его транскриптомные сигнатуры соответствовали нормальным герминативным центрам лимфатических узлов. В опухолях этой группы отмечалось высокое содержание фолликулярных дендритных клеток, CD4-положительных Т-хелперов, включая Tfh, а также не опухолевых В-лимфоцитов. Наличие этих компонентов отражает сохранение элементов нормальной лимфоидной архитектуры, обеспечивающей иммунный надзор. Пациенты с таким фенотипом имели лучший прогноз, что согласуется с предположением о поддержке противоопухолевого контроля за счет сохранения герминативных центров (Рисунок 4).

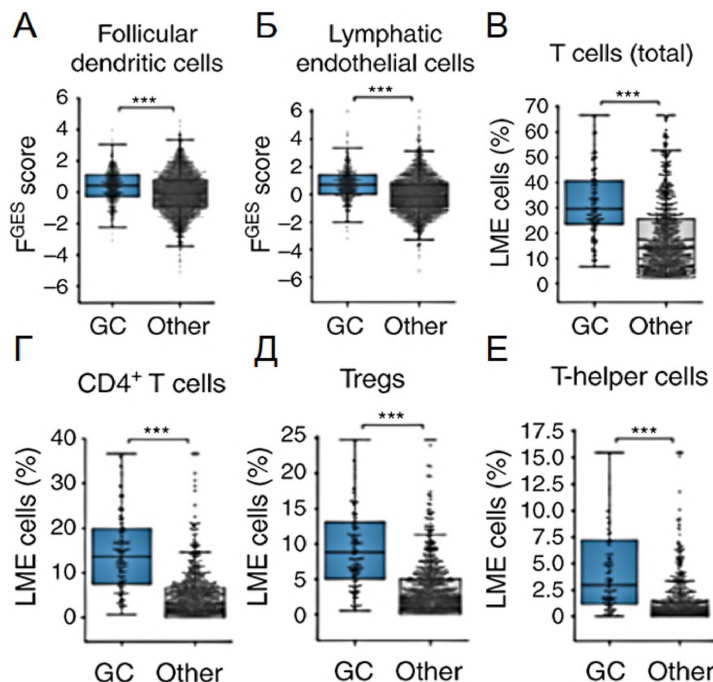


Рисунок 4. Сравнение значений сигнатур (А-Б) или процентов клеток (В-Е) между LME-GC и другими подтипами.

LME-MS характеризовался высоким содержанием фибробластов, эндотелиальных клеток и значительной экспрессией генов внеклеточного матрикса. В этих опухолях наблюдалась активация сигнальных путей TGFβ и гипоксии, что указывает на глубокую перестройку стромы и ремоделирование тканей (Рисунок 5).

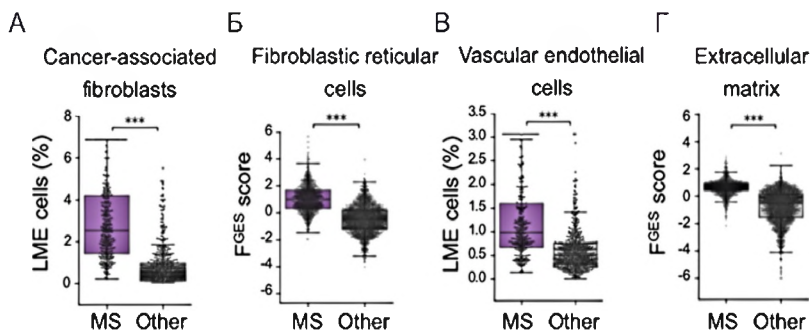


Рисунок 5. Сравнение значений сигнатур или процентов соответствующих клеток между LME-MS и другими подтипами.

LME-IN представлял собой воспалительный подтип с выраженной инфильтрацией CD8-положительных Т-лимфоцитов и NK-клеток. Продукция провоспалительных цитокинов была самая высокая, но и экспрессия супрессорных молекул, таких как IDO1 и PDL1 была наибольшей (Рисунки 6-7).

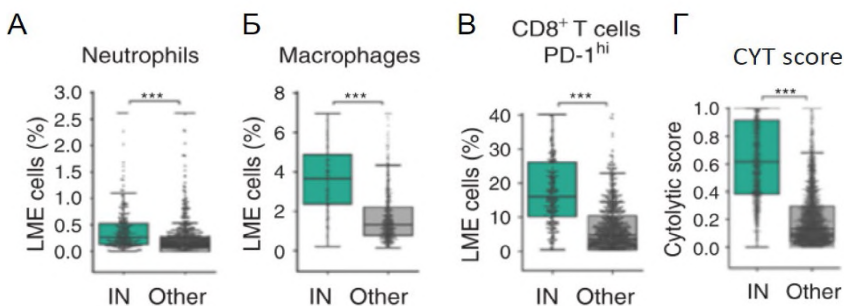


Рисунок 6. (А-Г) Сравнение процентов клеток и значений сигнатур между LME-IN и остальными кластерами.

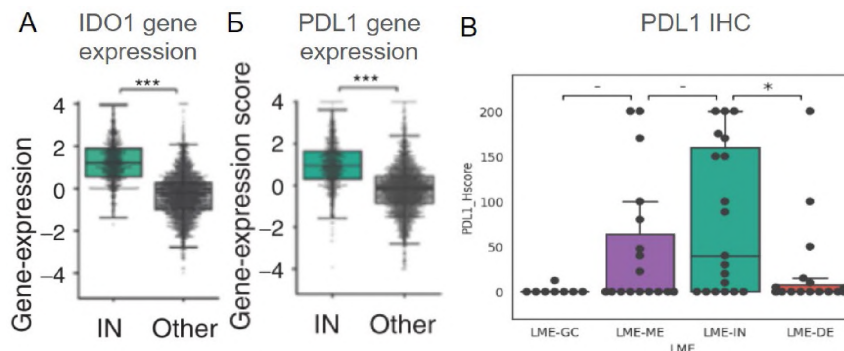


Рисунок 7. А, Б - сравнение экспрессии *IDO1* и *PDL1*; В - сравнение позитивности по PDL1 (IHC) между LME-IN и остальными кластерами.

Наиболее неблагоприятным оказался подтип LME-DP, характеризующийся обедненным микроокружением и низким содержанием как иммунных, так и стромальных клеток. В этих опухолях наблюдалась утрата экспрессии генов антиген-презентации, снижение уровней молекул МНС и эпигенетическое подавление сигнатур иммунной активности. Также сигнатуры пролиферации опухоли были самые высокие среди подтипов (Рисунки 8-9).

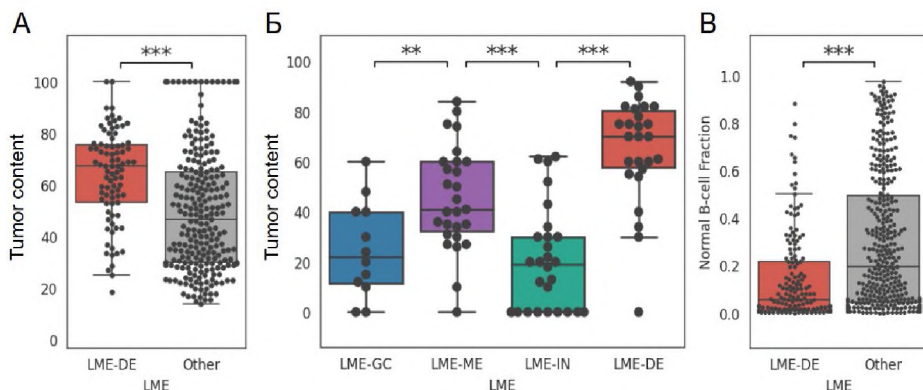


Рисунок 8. (А) — сравнение процента опухолевых клеток между подтипом LME-DE и остальными подтипами на Мета когорте. (Б) — сравнение процента опухолевых клеток между подтипами на когорте Mayo. (В) — сравнение процента нормальных В-клеток по данным В-клеточных репертуаров между LME-DE и остальными подтипами на Мета когорте.

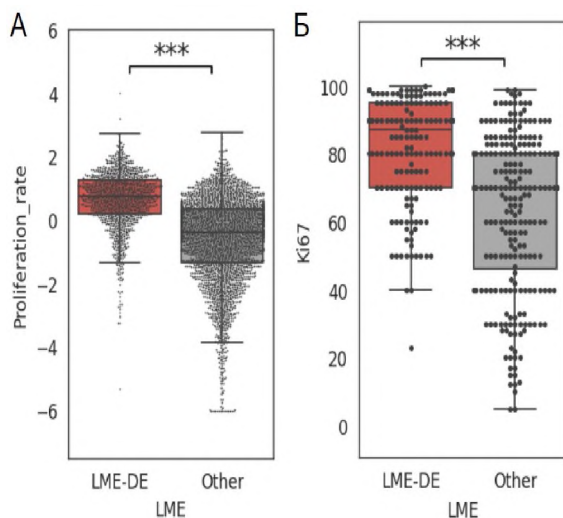


Рисунок 9. (А) – сравнение значений сигнатуры пролиферации между подтипом LME-DE и остальными подтипами на Мета когорте. (Б) – сравнение показателей пролиферации по маркеру Ki67, измеренных методом иммуногистохимии, между LME-DE и остальными подтипами на Мета когорте.

Валидация прогностической силы подтипов LME

Прогностическая значимость подтипов подтверждалась на мета когорте (Рисунок 10), а также во всех независимых когортах, включая клиническое исследование GOYA (Рисунок 11) и HMRN (Рисунок 12). Пациенты с LME-GC и LME-IN демонстрировали достоверно лучшую общую и безрецидивную выживаемость, что сохранялось и при многофакторном анализе с учетом индекса IPI и других клинических переменных. LME-MS имел промежуточные результаты, а LME-DP уверенно выделялся как группа высокого риска.

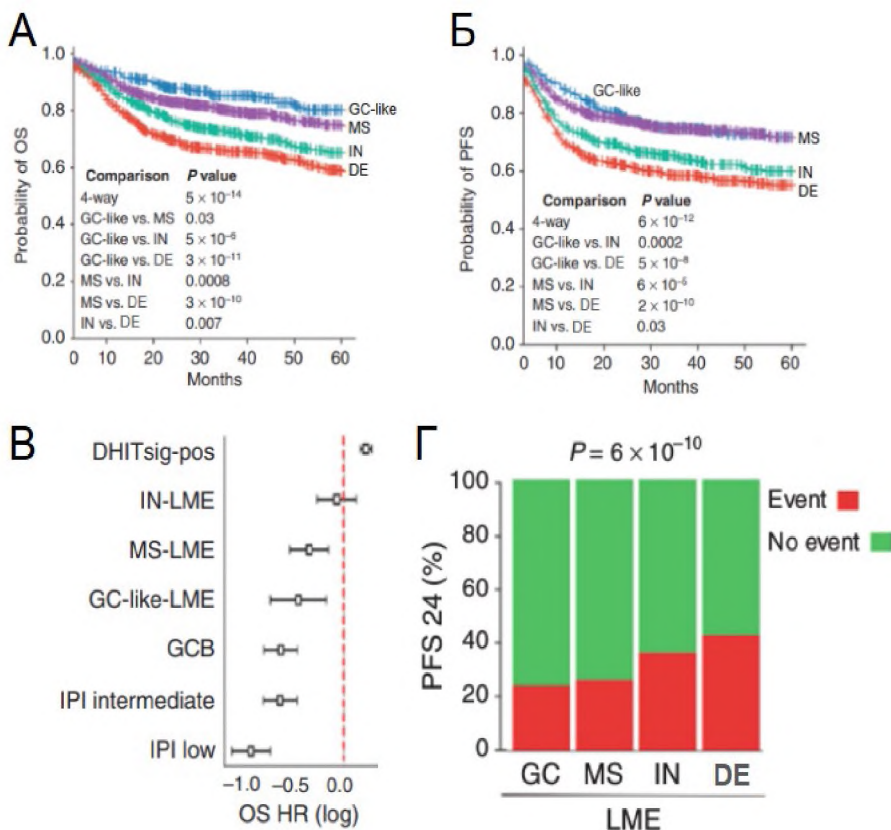


Рисунок 10. (А) – графики общей выживаемости (OS), (Б) – выживаемости без прогрессии (PFS), сравнение между LME подтипами, p-value рассчитано методом log-rank. (В) – результаты многомерного анализа по модели регрессии Кокса для LME подтипов с поправкой на DHITsig+, COO и IPI. (Г) – сравнение процента достижения PFS24 между LME подтипами, указан p-value критерия хи-квадрат.

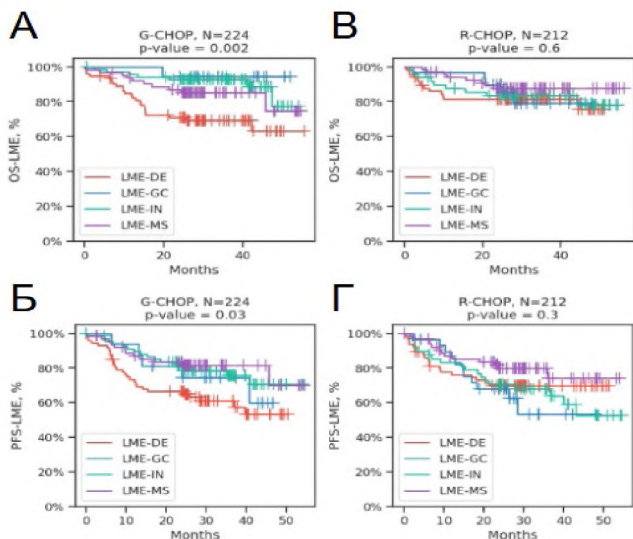


Рисунок 11. Сравнение OS и PFS между подтипами LME: (А-Б) когорты G-CHOP (GOYA), (В-Г) когорты R-CHOP (GOYA). В заголовках графиков указаны р-значения, рассчитанные с использованием четырехстороннего лог-рангового теста.

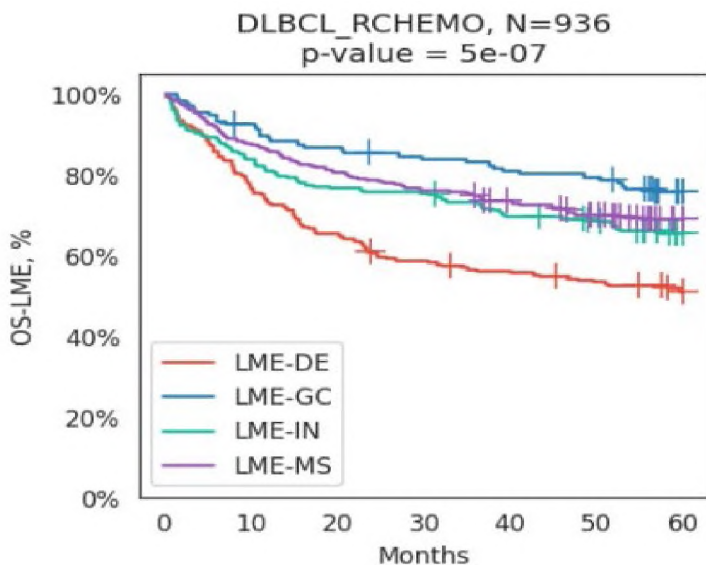


Рисунок 12. Кривые выживаемости для LME подтипов на когорте HMRN.

Подтип LME-DE обогащен CIMP опухолями. Лечение Азациитидином позволяет обратить этот фенотип, а также ре-активировать экспрессию опухолевых супрессоров, включая TGFb

Подтип LME-DP, характеризуется сочетанием крайне низкой клеточной плотности микроокружения и выраженных эпигенетических нарушений. Для него выявлена высокая степень метилирования ДНК (CIMP-подобный фенотип), охватывающая промоторные области множества генов, ответственных за антиген-презентацию, иммунную активацию и клеточную адгезию. Особенно значимым оказался гиперметилированный промотор гена *SMAD1* — ключевого медиатора пути TGF β . Это указывает на функциональное подавление антипролиферативных и дифференцировочных сигналов TGF β , что способствует утрате контроля над ростом опухоли и формированию иммуносупрессивной среды. В совокупности эпигенетическая инактивация генов, связанных с TGF β -сигналингом, и глобальный CIMP-фенотип создают для LME-DE типичный профиль «молчащего» микроокружения, в котором активность иммунных клеток минимальна, а опухоль избегает распознавания и уничтожения (Рисунок 13).

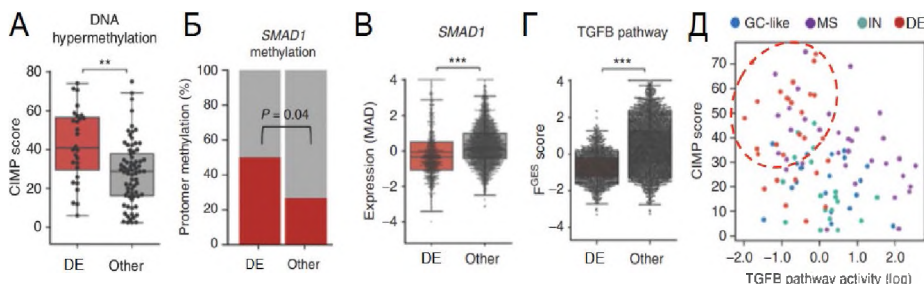


Рисунок 13. Подтип LME-DE характеризуется повышенным уровнем CIMP (А), более высокой частотой гиперметилирования промотора гена *SMAD1* (Б), сниженной экспрессией *SMAD1* (В) и пониженной активностью сигнального пути TGF β (Г) по сравнению с другими подтипами. (Д) — обогащение опухолей LME-DE в пространстве, определяемом уровнями CIMP и активностью TGF β .

Функциональная значимость эпигенетических нарушений в LME-DE была проверена в доклинических экспериментах с использованием ксенотрансплантатов опухолей DLBCL (PDTX-моделей). У животных, несущих LME-DE-подтип, наблюдалась низкая экспрессия генов антиген-презентации и сигнатур Т-клеточной инфильтрации, что воспроизводило профиль иммуносупрессивного микроокружения, выявленный в клинических образцах. Лечение деметилирующим агентом азацитидином вызывало частичное обращение этого состояния: восстанавливалась экспрессия генов МНС класса I и II, повышались уровни *SMAD1* и компонентов TGF β -сигналинга, в опухолевом микроокружении возрастало количество CD3⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Эти изменения сопровождалось уменьшением объема опухоли и замедлением роста ксенотрансплантатов. Таким образом, эпигенетическая терапия продемонстрировала способность функционально перепрограммировать иммуносупрессивное LME-DE-состояние, что подтверждает ключевую роль эпигенетического контроля в регуляции противоопухолевого иммунного ответа при DLBCL (Рисунки 14-15).

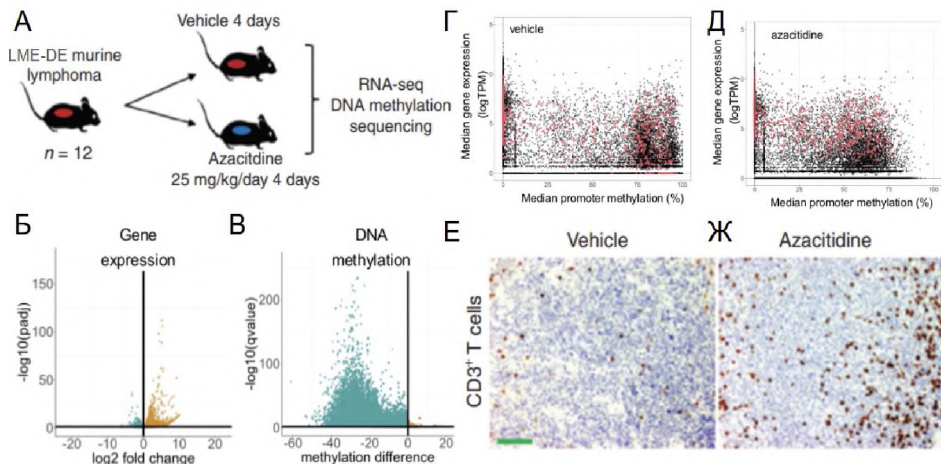


Рисунок 14. (А) дизайн эксперимента; (Б) график вулкан дифференциальной экспрессии генов между опухолями, обработанными азациитидином, и контролем; (В) график вулкан дифференциального метилирования; (Г, Д) сравнение экспрессии и уровня метилирования промотора в контрольном и обработанном образцах, красным отмечены гены с повышенной экспрессией после лечения; (Е, Ж) репрезентативные регионы опухолей, окрашенных на CD3⁺, в контрольной и леченной группах соответственно.

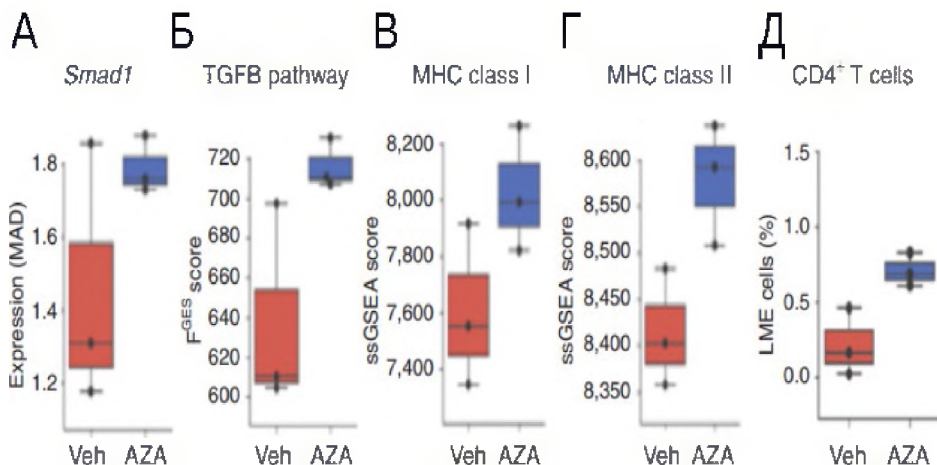


Рисунок 15. (А–Д) сравнение экспрессии гена *SMAD1*, активности сигнального пути TGFb, экспрессии молекул MHC I и II классов, а также доли CD4⁺ Т-лимфоцитов между контрольными опухолями и образцами после лечения азациитидином.

Экспрессия бигликана и декорина выше в LME-ME. Их экспрессия ассоциирована с лучшим прогнозом

Экспрессия генов декорина и бигликана была значимо выше в подтипе LME-MS на расширенной когорте пациентов, что согласуется с повышенной представленностью

фибробластов в данной группе. Более того, высокая экспрессия этих генов (выше медианного уровня по всей когорте) ассоциировалась с благоприятным прогнозом даже в подтипе LME-DE (Рисунок 16). Протеогликаны в микроокружении лимфом могут оказывать влияние на опухоли через взаимодействие с факторами роста, рецепторами и другими компонентами внеклеточного матрикса[Neill et al., 2012].

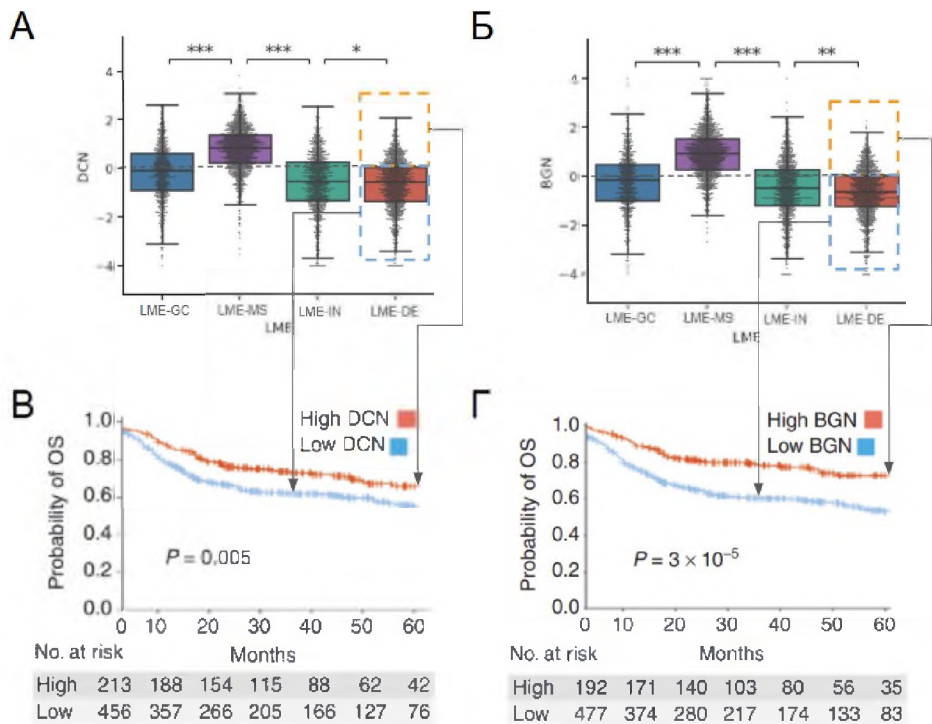


Рисунок 16. Экспрессия декорина (А) и бигликана (Б) отличается между подтипами LME, и максимальна в LME-MS. Далее кривые выживаемости, показывающие разницу дожития пациентов с высоким (> медианы по всей когорте) и низким значением декорина (В) и бигликана (Г) среди пациентов подтипа LME-DE.

Введение декорина и бигликана останавливали рост опухолей в ксенографитных моделях DLBCL

Для оценки функциональной роли компонентов внеклеточного матрикса были проведены эксперименты на ксенотрансплантатных моделях DLBCL, полученных из опухолей пациентов с подтипами ABC и LME-DE. После имплантации опухолевых фрагментов и достижения заданного размера животным вводили в брюшинную полость контрольные векторы, а также препараты, содержащие рекомбинантные формы декорина или бигликана, в соответствии со схемой, представленной на (Рисунок 17А). В обоих типах моделей введение декорина или бигликана приводило к выраженному замедлению роста опухолей по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о прямом влиянии этих матриксных белков на динамику опухолевого процесса. После прекращения введений рост опухолей возобновлялся, достигая темпов, сопоставимых с контролем (Рисунок 17Б–Д). Эти

результаты подтверждают, что как декорин, так и бигликан способны модифицировать микроокружение DLBCL и временно ограничивать пролиферацию опухолевых клеток *in vivo*.

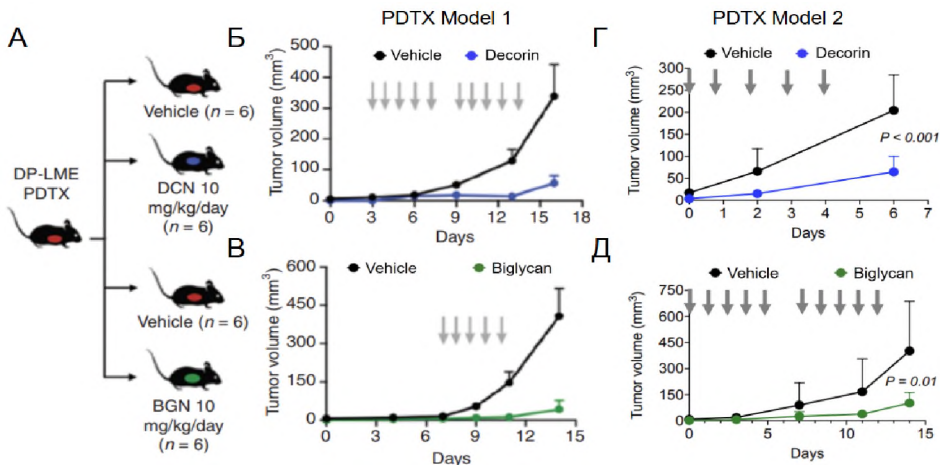


Рисунок 17. (А) схема проведения эксперимента по введению декорина или бигликана в модели ксенографтов; (Б, В) динамика относительного объема опухолей при введении декорина (Б) или бигликана (В) в модели 1; (Г, Д) аналогичное сравнение для модели 2.

Связь репертуара В-клеточного рецептора лимфомы с микроокружением

Были проанализированы перестройки генов иммуноглобулиновых цепей по данным RNA-seq для определения особенностей репертуара В-клеточного рецептора (BCR) в разных биологических контекстах DLBCL. Подтипы микроокружения отличались по использованию сегментов IGHV и изотипов иммуноглобулинов: для LME-GC характерно преобладание зрелых соматических гипермутационных вариантов, тогда как LME-DP чаще ассоциировался с наивными или несостоявшимися перестройками. Генетические подтипы также демонстрировали различия в паттернах IGHV, что отражает разную стадию происхождения опухолевых клонов и их взаимодействие с микроокружением.

Дефицит FAS в DLBCL ассоциирован с воспаленным фенотипом, но неблагоприятным прогнозом

Известно, что одним из ключевых механизмов селекции В-клеток в герминативном центре является FAS/FASL-индуцированный апоптоз (Обзор литературы 1.2.7). Утрата FAS ведет к нарушению этого механизма отбора В-клеток с низким аффинитетом к антигену и способствует выживанию потенциально аутореактивных или менее эффективных клонов. Закономерным образом, инактивация FAS через мутации особенно характерна для GCB-подтипа DLBCL. Несмотря на то, что GCB-лимфомы в целом ассоциированы с более благоприятным прогнозом, у части пациентов заболевание оказывается устойчивым к терапии и прогрессирует. При этом, функциональная роль FAS в взаимодействии с микроокружением DLBCL остается мало изученной.

Мутации гена FAS были обнаружены преимущественно в опухолях подтипа GCB и встречались значительно реже в ABC и UNC DLBCL. Внутри GCB-подтипа наличие мутаций FAS ассоциировалось с достоверно худшей общей выживаемостью, тогда как в ABC-подтипе подобной зависимости не наблюдалось. Из 97 выявленных мутаций почти половина

приводила к полной утрате домена гибели (DD), необходимого для активации апоптоза, а еще около трети — к патогенным заменам в пределах DD (Рисунок 18).

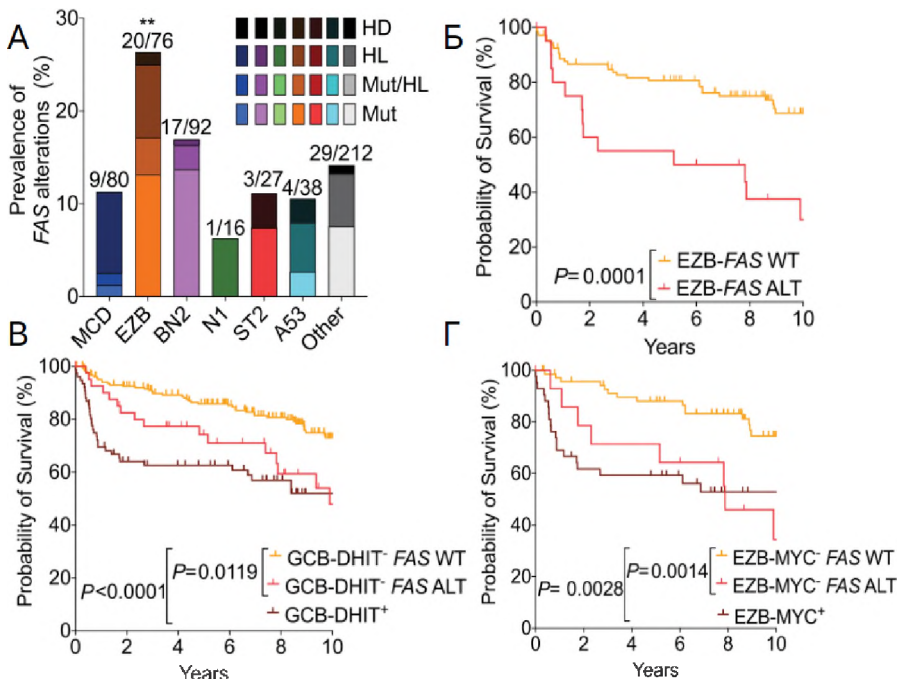


Рисунок 18. (А) частота мутаций в FAS в когорте NCICCR с распределением по генетическим подтипам HL: heterozygous loss, HD: homozygous deficiency, Mut/HL mutation and heterozygous loss, Mut: mutation; (Б) сравнение OS между FAS-alt и FAS-WT опухолями среди подтипа EZB; (В) OS пациентов с GCB-опухолями, стратифицированными на группы DHIT⁺, FAS-alt и FAS-WT; (Г) OS в подгруппах EZB: MYC⁺, MYC⁻ с мутациями FAS и MYC⁻ без мутаций FAS.

Дальнейший анализ показал, что альтерации FAS преимущественно встречаются в генетическом подтипе EZB и взаимно исключаются с активацией MYC, типичной для DHITsig⁺ опухолей. Опухоли с мутациями FAS демонстрировали значительно худшую выживаемость как в пределах всей группы EZB, так и среди подмножеств без MYC-активации, что подтверждает независимую прогностическую значимость дефицита FAS. В этих опухолях часто выявлялись сопутствующие альтерации TNFRSF14, CD274 (PDL1), IRF8 и S1PR2, что указывает на нарушение регуляции взаимодействий между опухолевыми клетками и Tfh. Сравнение четырех подгрупп EZB DLBCL показало, что худшие клинические исходы характерны именно для FAS-alt опухолей, тогда как обе группы FAS-WT, независимо от статуса TNFRSF14, имели достоверно лучший прогноз. Эти результаты подтверждают, что функциональная потеря FAS формирует особый биологический и клинический контекст в пределах GCB/EZB DLBCL, ассоциированный с воспаленным фенотипом и неблагоприятным течением заболевания.

В ходе анализа мутационного профиля DLBCL выявлено, что нарушения в гене FAS встречаются преимущественно в подтипах, характеризующихся высоким уровнем

воспаления и инфильтрацией Т-клеток. При этом такие опухоли демонстрировали парадоксальное сочетание признаков активации противоопухолевого иммунитета с неблагоприятными клиническими исходами. Сравнение выживаемости пациентов с EZB-подтипом DLBCL показало, что опухоли с мутациями FAS (FAS-alt) характеризуются значительно худшей общей выживаемостью по сравнению с FAS-WT независимо от наличия альтераций TNFRSF14, что подтверждает независимую прогностическую значимость дефицита FAS. При этом в группе EZB FAS-alt MYC⁻ не наблюдалось обогащения каким-либо подтипом микроокружения, однако полностью отсутствовали случаи LME-DE, ассоциированные с эпигенетическим подавлением. Анализ экспрессионных сигнатур показал, что FAS-alt опухоли имели повышенные значения Tfh-сигнатуры, указывая на усиленную инфильтрацию Tfh-клеток и перестройку герминативно-подобной ниши. Эти данные позволяют предположить, что дефицит FAS приводит к смещению иммунного микроокружения в сторону повышенной активности Tfh при одновременном снижении вероятности формирования иммуносупрессивного LME-DE фенотипа, что отражает сложное взаимодействие мутационного статуса опухоли и ее микроокружения (Рисунок 19).

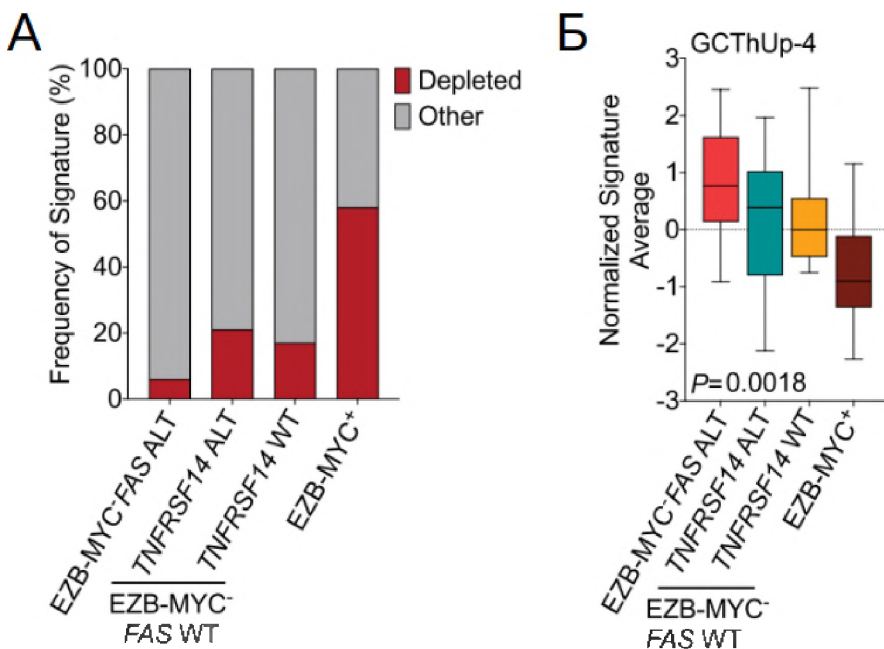


Рисунок 19. (А) доля опухолей подтипа LME-DE в каждой из четырех групп, стратифицированных по статусу MYC, FAS и TNFRSF14; (Б) значения сигнатуры Tfh (GCThUp-4)[Shaffer et al., 2006] в тех же группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлена система подтипов опухолевого микроокружения LME в DLBCL, основанная на транскриптомных данных. Разработанная классификация отражает воспроизводимые биологические различия в составе опухоли и обладает как прогностической, так и потенциальной предиктивной значимостью. Это подтверждается тем, что ассоциация LME с ответом на терапию уже используются в качестве вторичных конечных точек (secondary endpoint) в современных клинических исследованиях, включая клинические испытания GUIDANCE-01[3] и NCT05464823[4].

LME устойчиво ассоциированы с клинико-патологическими характеристиками опухоли, включая классификацию по СОО, молекулярные сигнатуры иммунного ответа, экспрессию супрессоров и регуляторов активации, а также сигнальные пути, вовлеченные в коммуникацию между опухолевыми и иммунными клетками. Прогностическая значимость LME-подтипов подтверждена на независимых когортах: иммунно-активные формы LME-GC и LME-MS ассоциированы с благоприятным клиническим исходом, тогда как подтипы LME-IN, LME-DE — с иммуносупрессивным и эпигенетически подавленным состоянием, а также с худшей выживаемостью.

Функциональная значимость микроокружения была подтверждена в доклинической модели: ксеногraftы с фенотипом LME-DE демонстрировали ответ на лечение азацитидином, сопровождающийся деметилированием промоторов, активацией опухолевых супрессоров, усилением экспрессии молекул МНС и инфильтрацией Т-лимфоцитов. Эти данные лежали в основе дизайна клинических испытаний с использованием AZA в DLBCL: NCT01004991[6], NCT04799275[7].

Помимо этого, в генетических подтипах MCD, BN2 и A53 было продемонстрировано обогащение изотипа IgM и сегментаIGHV4-34, что связано с активацией сигнального каскада БКР и меньшей зависимостью от микроокружения. Дополнительно было показано, что в опухолях с IgM-изотипом присутствует значимое обогащение мутаций гена *CD79B* — ключевого компонента сигнального комплекса БКР. Эти данные подчеркивают важность взаимодействия между структурой БКР и мутационным профилем.

Интеграция данных о микроокружении и мутациях позволила идентифицировать ранее не описанный агрессивный подтип GCB DLBCL с мутациями в *FAS*, сопровождающийся нарушением апоптоза и сопутствующей инактивацией *TNFRSF14* и *PDL1*. Эти опухоли демонстрировали повышенное количество Tfh, при этом значимо реже были LME-DP, но при этом были ассоциированы с неблагоприятным клиническим исходом. Это подчеркивает сложное взаимодействие между нарушениями клеточной смерти, иммунной регуляцией и композицией микроокружения.

Таким образом, проведенная работа демонстрирует ценность комплексного подхода к характеристике опухоли, сочетающего транскриптомные, мутационные и иммунологические данные. Полученные результаты являются основой для создания прогностических моделей, рационального дизайна терапии и внедрения молекулярной стратификации в клиническую практику при DLBCL.

ВЫВОДЫ

1. Предложена и верифицирована классификация LME-подтипов, включающая четыре устойчивых биологических состояния опухолевого микроокружения, воспроизводимых на разных когортах.
2. Подтипы LME демонстрируют значимые ассоциации с клеточным происхождением опухоли, сигнатурами иммунной активности и эпигенетическим статусом, отражая функциональное состояние опухоли и ее взаимодействие с микроокружением.
3. Прогностическая ценность подтипов LME валидирована на данных консорциума HMRN при лечении стандартной комбинацией с ритуксимадом R-CHЕМО. Кроме того, подтипы LME обладают прогностической ценностью при терапии другим антителом против CD20 - обинутумабом, что подтверждено на данных исследования GOYA. Это позволяет использовать их в рамках клинических стратификаций.
4. Иммуносупрессивный подтип LME-DE может быть функционально обращен в доклинической модели под действием азацитидина, что сопровождается активацией опухолевых супрессоров, повышением экспрессии MHC и Т-клеточной инфильтрацией.
5. Генетические подтипы и типы микроокружения DLBCL различаются по использованию изоформ и сегментов IGHV, что связано с мутациями в сигнальных белках BCR. Это подчеркивает важность взаимодействия BCR-сигналинга с генетическим контекстом и микроокружением при патогенезе DLBCL.
6. Интеграция данных о составе микроокружения и мутационном ландшафте позволила выявить агрессивный подтип GCB DLBCL, характеризующийся мутациями в FAS и сопутствующими нарушениями регуляции взаимодействия с Tfh, несмотря на воспаленный фенотип.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Tumuluru S, Godfrey JK, Cooper A, Yu J, Chen X, MacNabb BW, Venkataraman G, Zha Y, Pelzer B, Song J, Duns G, Sworder BJ, Raj S, Bolen C, Penuel E, Postovalova E, Kotlov N, Bagaev A, Fowler N, Shouval R, Smith SM, Alizadeh AA, Steidl C, Kline J. Integrative genomic analysis of DLBCL identifies immune environments associated with bispecific antibody response. **Blood**. 2025 May 22;145(21):2460-2472. doi: 10.1182/blood.2024025355.
2. Котлов Н.Ю. Валидация прогностической силы подтипов микроокружения крупноклеточной лимфомы при лечении обинутумабом в первой линии. Вестник РАУ. 2024;1:67-73. DOI: 10.24412/1829-0450-fm-2024-1-67-74
3. Cooper A, Tumuluru S, Kissick K, Venkataraman G, Song JY, Lytle A, Duns G, Yu J, Kotlov N, Bagaev A, Hodgkinson B, Srinivasan S, Smith SM, Scott DW, Steidl C, Godfrey JK, Kline J. CD5 Gene Signature Identifies Diffuse Large B-Cell Lymphomas Sensitive to Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition. **J Clin Oncol**. 2024 Feb 1;42(4):467-480. doi: 10.1200/JCO.23.01574.

4. Kotlov N, Bagaev A, Revuelta MV, Phillip JM, Cacciapuoti MT, Antysheva Z, Svekolkina V, Tikhonova E, Mihecheva N, Kuzkina N, Nos G, Tabbo F, Frenkel F, Ghione P, Tsiper M, Almog N, Fowler N, Melnick AM, Leonard JP, Inghirami G, Cerchietti L. Clinical and Biological Subtypes of B-cell Lymphoma Revealed by Microenvironmental Signatures. **Cancer Discov.** 2021 Jun;11(6):1468-1489. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0839.
5. Razzaghi R, Agarwal S, Kotlov N, Plotnikova O, Nomie K, Huang DW, Wright GW, Smith GA, Li M, Takata K, Yamada M, Yao C, O'Shea JJ, Phelan JD, Pittaluga S, Scott DW, Muppidi JR. Compromised counterselection by FAS creates an aggressive subtype of germinal center lymphoma. **J Exp Med.** 2021 Mar 1;218(3):e20201173. doi: 10.1084/jem.20201173.
6. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, Wang JQ, Schmitz R, Morin RD, Tang J, Jiang A, Bagaev A, Plotnikova O, Kotlov N, Johnson CA, Wilson WH, Scott DW, Staudt LM. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. **Cancer Cell.** 2020 Apr 13;37(4):551-568.e14. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.015.

Կոտլով Նիկիտա Յուրիի
Դիֆուզ խոշոր բջջային լիմֆոմայի միկրոմիջավայրի ենթատեսակների
մոլեկուլային դասակարգում և ուսումնասիրություն տրանսկրիպտոմային
տվյալների հիման վրա

Ամփոփում

Դիֆուզ խոշոր B բջջային լիմֆոման (DLBCL) ոչ հոջկինյան լիմֆոմայի ամենատարածված և կենսաբանորեն ամենատարասեռ ենթատիպն է՝ չափահասների մոտ կազմելով դեպքերի մինչև 40%-ը: Չնայած ստանդարտ իմունաքիմիաթերապիայի (R-CHOP) բարձր բուժական արդյունավետությանը՝ մոտ մեկ երրորդ հիվանդների մոտ զարգանում է ռեցիդիվ կամ բուժման նկատմամբ կայուն ձև, ինչն ընդգծում է հիվանդության մոլեկուլային ենթատիպերի տարբերական և անհատականացված բուժական ռազմավարությունների մշակման անհրաժեշտությունը: Վերջին տարիների գենոմային հետազոտությունները էապես խորացրել են մեր պատկերացումները ուռուցքային բջիջներին բնորոշ փոփոխությունների մասին, սակայն ուռուցքային միկրոմիջավայրի (TME) կապը կլինիկական ելքի հետ դեռևս բավարար չափով ուսումնասիրված չէ:

Այս աշխատանքի նպատակն է մշակել դիֆուզ խոշոր բջջային B-լիմֆոմայի ուռուցքային միկրոմիջավայրի ենթատիպերի մոլեկուլային դասակարգում և ուսումնասիրել դրանց կենսաբանական առանձնահատկությունները, կլինիկական նշանակությունն ու կապը ուռուցքի գենետիկական փոփոխությունների հետ:

Ավշային հյուսվածքի ավելի քան 5000 նմուշների՝ ներառյալ 4655 DLBCL ուռուցքներից ստացված, համապարփակ տրանսկրիպտոմային վերլուծությունը հնարավորություն է տվել վերականգնել միկրոմիջավայրի բջջային կազմը՝ կիրառելով 276 գեններից բաղկացած իմունային, ստրոմալ և հիմնական ազդանշանային ուղիների ֆունկցիոնալ գենային հավաքածուներ: Տվյալների չվերահսկվող կլաստերավորումը բացահայտել է լիմֆոմայի միկրոմիջավայրի (LME) չորս կայուն և վերարտադրելի ենթատիպ՝ LME-GC (գերմինատիվ կենտրոնանման), LME-MS (մեզենքիմալ), LME-IN (բորբոքային) և LME-DE (սպառված): Այս ենթատիպերը վալիդացվել են անկախ ընտրանքներում՝ ցույց տալով դրանց կենսաբանական կայունությունը:

Յուրաքանչյուր ենթատիպ բնութագրվում է չարորակ B բջիջների և հարակից հյուսվածքի փոխազդեցության յուրահատուկ ձևով: Մասնավորապես, LME-GC-ի դեպքում դիտվում է լավ արտահայտված գերմինատիվ կենտրոն՝ հարուստ ֆոլիկուլային դենդրիտային բջիջներով, T helper բջիջներով և ոչ չարորակ B բջիջներով: LME-IN ենթատիպը բնորոշվում է ակտիվ բորբոքային միջավայրով՝ ցիտոտոքսիկ CD8⁺ T և NK բջիջների գերակշռությամբ, որոնք արտադրում են հարբորբոքային ցիտոկիններ: LME-MS-ում դիտվում է ֆիբրոբլաստների պրոլիֆերացիա, արտաբջջային մատրիքսի վերաձևավորում և TGFβ-կախյալ ստրոմալ ակտիվացում: Մինչդեռ LME-DE ենթատիպը բնութագրվում է իմունային և ստրոմալ տարրերի զգալի նվազեցմամբ և էպիգենետիկական ճնշման մարկերներով:

Վերլուծությունները ցույց են տվել, որ LME դասակարգումն ունի պրոգնոստիկ կլինիկական արժեք՝ անկախ այլ պարամետրերից: LME-GC և LME-IN ենթատիպերը

ասոցացվում են ապրելիության բարձր, իսկ LME-MS-ը՝ միջին ցուցանիշների հետ: Մինչդեռ LME-DE-ն բնութագրվում է ստանդարտ թերապիայի նկատմամբ կայունությամբ և բարձր մահացությամբ: Այս արդյունքները հաստատում են ուռուցքային միկրոմիջավայրի դերը՝ որպես DLBCL-ի պրոգնոստիկ կարևոր գործոն: LME-DE նմուշներում դեմոթիլացնող ազացիտիդինի կիրառումը հանգեցրել է էպիգենետիկական ճնշված ֆենոտիպի մասնակի բարելավման՝ *SMAD1* և *MHC* գեների ակտիվացման, TGF β ազդանշանային ուղու վերականգնման, CD3 $^{+}$ ու CD8 $^{+}$ T քջիջների ներթափանցման բարձրացման: Այս արդյունքները վկայում են, որ իմունաբանորեն «լուռ» լիմֆոմաները կարող են էպիգենետիկորեն վերածրագրավորվել իմունային ակտիվ վիճակի՝ հիմնավորելով հիպոմեթիլացնող միջոցների կլինիկական կիրառման նպատակահարմարությունը DLBCL որոշ ենթատիպերի դեպքում:

Ցույց է տրվել արտաբջջային մատրիքսի պրոտեոգլիկաններ դեկորինի և բիգլիկանի ակտիվ մասնակցությունը ուռուցք-ստրոմա փոխազդեցության մեջ: Դեկորինի բարձր էքսպրեսիան կոռելացվում է իմունային ակտիվացման և ապրելիության բարձր ցուցանիշների հետ, մինչդեռ բիգլիկանի դեպքում՝ քրոնիկ բորբոքման և անբարենպաստ ելքի հետ: ABC և LME-DE ուռուցքների ժամանակ ռեկոմբինանտ դեկորինի կամ բիգլիկանի ընդունումը զգալիորեն դանդաղեցնում է ուռուցքի աճը: Ստացված տվյալները վկայում են, որ այս պրոտեոգլիկանները կարող են դիտարկվել որպես հնարավոր թերապևտիկ թիրախներ:

Գենետիկական փոփոխությունների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ *FAS* գենի մուտացիաները զգալիորեն հարստացած են DLBCL-ի GCB և EZB մոլեկուլային ենթատիպերում և հազվադեպ են համընկնում MYC ակտիվացման հետ՝ մատնանշելով որոշակի էվոլյուցիոն ուղիներ: *FAS* մուտացիաները խաթարում են ապոպտոզի ազդանշանի փոխանցումը և նմանակում աուտոիմունային լիմֆոպրոլիֆերատիվ համախտանիշի ժամանակ դիտվող մուտացիաները: *FAS* սպիտակուցի կորուստ ունեցող ուռուցքներն ունեն բորբոքային, սակայն ֆունկցիոնալ առումով սպառված միկրոմիջավայր՝ T helper և ցիտոտոքսիկ T քջիջների բարձր ներթափանցմամբ, բայց նվազած ապոպտոտիկ զգայունությամբ: Կլինիկորեն այդպիսի դեպքերը ցուցաբերել են ապրելիության ավելի վատթար ցուցանիշներ՝ անկախ TNFRSF14 կամ MYC կարգավիճակից, ինչը հաստատում է *FAS*-ը՝ որպես անբարենպաստ ելքի անկախ ցուցանիշ:

Ընդհանուր առմամբ, ստացված արդյունքները ձևավորում են ինտեգրատիվ մոլեկուլային պատկեր, որը կապում է ուռուցքային քջիջների գենետիկական և էպիգենետիկական փոփոխությունները միկրոմիջավայրի կառուցվածքի և ֆունկցիայի հետ DLBCL-ի դեպքում: Առաջարկվող LME մոլեկուլային դասակարգումը արտացոլում է կենսաբանորեն վերարտադրելի և կլինիկական առումով նշանակալի տարասեռություն՝ ապահովելով պրոգնոստիկ և պրեդիկտիվ արժեք: Արդյունքները ներառվել են ընթացիկ կլինիկական փորձարկումներում (օր.՝ GUIDANCE-01, NCT054648234) և ընդգծում են միկրոմիջավայրը թիրախավորող և էպիգենետիկական թերապիաների ներուժը՝ ագրեսիվ B բջջային լիմֆոմաների դեպքում արդյունավետ հակաուռուցքային իմունիտետի վերականգնման համար:

Molecular classification and characterization of tumor microenvironment subtypes in diffuse large B-cell lymphoma based on transcriptomic data

Summary

Keywords: Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL); tumor microenvironment (LME); transcriptomic profiling; immune subtypes; decorin; biglycan; azacitidine; prognostic biomarkers

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most frequent and biologically heterogeneous subtype of non-Hodgkin lymphoma, accounting for up to 40% of all adult cases. Despite the curative potential of standard immunochemotherapy (R-CHOP), approximately one third of patients relapse or develop refractory disease, highlighting the urgent need for molecular stratification and personalized therapeutic approaches. Recent genomic studies have expanded our understanding of tumor-intrinsic alterations; however, the role of the tumor microenvironment (TME) in determining clinical outcome remains insufficiently characterized.

This study aimed to develop an integrative molecular classification of DLBCL that incorporates transcriptomic, genetic, and epigenetic features of both tumor and non-malignant components of the lymph node ecosystem.

Comprehensive transcriptomic analysis of over 5000 lymphoid tissue samples, including 4655 DLBCL tumors, allowed systematic reconstruction of the cellular composition of the microenvironment. Based on a curated panel of 276 genes grouped into 22 biologically interpretable signatures, the expression profiles were deconvoluted to quantify immune, stromal, and signaling components. Unsupervised clustering of these data revealed four robust and reproducible microenvironmental subtypes, collectively termed Lymphoma MicroEnvironment (LME) classes: germinal-center-like (LME-GC), mesenchymal (LME-MS), inflammatory (LME-IN), and depleted (LME-DE). These subtypes were consistently identified across independent cohorts and sequencing platforms, confirming their biological stability.

Each LME subtype represents a distinct mode of interaction between malignant B-cells and their surrounding tissue. LME-GC recapitulates the structure of a normal germinal center, enriched in follicular dendritic cells, helper T cells, and non-malignant B cells. LME-IN reflects an activated, inflammatory milieu dominated by cytotoxic CD8⁺ T cells and NK cells producing proinflammatory cytokines. LME-MS is characterized by fibroblast proliferation, extracellular matrix remodeling, and strong TGFβ-driven stromal activation. In contrast, LME-DE exhibits marked depletion of immune and stromal elements, global DNA hypermethylation (CIMP phenotype), and silencing of antigen-presentation and interferon-response genes.

Prognostic analysis across multiple cohorts demonstrated that LME classification has strong and independent clinical relevance. Patients with LME-GC and LME-IN tumors had significantly better overall and progression-free survival, even after adjustment for IPI and COO. The LME-MS subtype showed intermediate outcomes, while LME-DE was associated with resistance to standard therapy and the poorest survival rates. These findings establish the microenvironment as a critical determinant of prognosis in DLBCL.

Functional experiments further confirmed the biological impact of microenvironmental states. In patient-derived xenografts (PDX) of the LME-DE subtype, treatment with the demethylating agent azacitidine led to partial reversal of the epigenetically suppressed phenotype: upregulation of SMAD1 and MHC genes, restoration of TGFβ signaling, and increased infiltration of CD3⁺ and CD8⁺ T cells. These results provide experimental evidence that immunologically “silent” lymphomas can be epigenetically reprogrammed toward an immune-reactive state, supporting the rationale for clinical application of hypomethylating agents in selected DLBCL subtypes.

Further investigation of extracellular matrix proteoglycans decorin (DCN) and biglycan (BGN) revealed their active involvement in tumor–stroma interactions. High expression of DCN correlated with immune activation and improved survival, whereas BGN was linked to chronic inflammation and poor outcome. In xenograft experiments using ABC and LME-DE tumors, intraperitoneal administration of recombinant decorin or biglycan significantly slowed tumor growth, which resumed after treatment cessation. These results confirm that structural matrix components can modulate tumor behavior in vivo and represent potential therapeutic targets.

Integrative analysis of genetic alterations revealed that FAS mutations are highly enriched in the GCB and EZB molecular subtypes of DLBCL and rarely co-occur with MYC activation, indicating distinct evolutionary pathways. Most FAS mutations affected the death domain, disrupting apoptosis signaling and mimicking mutations observed in autoimmune lymphoproliferative syndrome. Tumors harboring FAS loss exhibited an inflamed yet functionally exhausted immune microenvironment, with increased infiltration of T_H and cytotoxic T cells but reduced apoptotic sensitivity. Clinically, FAS-deficient cases had significantly worse overall survival, independent of TNFRSF14 or MYC status, underscoring FAS as an independent marker of adverse outcome.

Together, these findings define an integrated molecular framework connecting tumor-intrinsic genetic and epigenetic alterations with the structure and function of the surrounding microenvironment in DLBCL. The proposed LME classification captures biologically reproducible and clinically relevant heterogeneity, offering both prognostic and predictive insights. The results have been incorporated as a secondary endpoint in ongoing clinical trials (e.g., GUIDANCE-01, NCT054648234) and highlight the potential for microenvironment-targeted and epigenetic therapies to restore effective antitumor immunity in aggressive B-cell lymphomas.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Kurt', located at the bottom right of the page.