

A diffúz nagy B-sejtes limfóma genetikai és patológiai sajátosságai

SZEPESI ÁGOTA

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Levezézési cím:

Dr. Szepesi Ágota, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, 1085 Üllői út 26. Tel.: +36208250262, e-mail: szepesi.agota@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2015. december 20.

Elfogadva:

2016. január 28.

A diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) érett B-limfocitákból kiinduló, magas malignitású folyamat, amely a limfoproliferatív betegségek közel 30%-át kitevő leggyakoribb felnőttkori nyirokszervi tumor. A betegség klinikai, morfológiai, fenotípusos és genetikai szinten is rendkívül heterogén, amelynek hátterében már számos tényezőt azonosítottak: a limfomagenezis a B-sejt-fejlődés eltérő szakaszaiban alakul ki (sejteredet), eltérő jelátviteli pályákon keresztül valósul meg, valamint az epigenetikai módosulások és az immun surveillance kikerülését elősegítő mutációk is további változatos genetikai hátteret adnak a daganatoknak. A jelenlegi terápiával az esetek mintegy 30%-a nem gyógyítható. A túlélési eredmények javításának érdekében új biomarkerek definiálására van szükség, amelyek a limfomagenezis által meghatározott jelátviteli útvonalak szerint további csoportosítást és célzott terápiát tesznek lehetővé. Az alábbi összefoglaló célja a legfontosabb morfológiai, fenotípus- és genotípuszinten meghatározható, a betegség kimenetelét befolyásoló tényezők bemutatása és gyakorlati útmutató a jelenleg rutinszerűen alkalmazható, diagnosztikai és prognosztikai jelentőséggel bíró patológiai, molekuláris módszerekhez a kemo-immunterápiával kezelt DLBCL tumorok esetében. Magyar Onkológia 60:99-107, 2016

Kulcsszavak: diffúz nagy B-sejtes limfóma, centrum germinativum B-sejt, aktivált B-sejt, prognosztikus faktor, biomarker

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a high-grade lymphoproliferative disease of mature B cells, representing the most common lymphoid malignancy of adulthood. There are multiple distinct subgroups of DLBCL in the 2008 WHO classification, organ specific forms, DLBCL associated with immunodeficiency and viral infections and rare CD20 negative and intermediate forms. However, most of the cases are still classified under the DLBCL not otherwise specified (NOS) category. This group of disease shows remarkable heterogeneity with respect to clinical presentation, biology and response to treatment, reflecting several molecular subgroups: the origin of B cells at various developmental stages, the oncogenic pathways that drive tumor development and also epigenetic changes and mutations involving the escape of immune surveillance. Contemporary chemo-immunotherapy does not result in durable remissions in as many as 30% of the cases. To achieve longer survival, the definition of new biomarkers are needed for targeted therapy based on better subgrouping of tumors according to the molecular pathways involved in lymphomagenesis. This paper summarizes the most important features influencing the outcome of this broad disease at the level of morphology, phenotype and genotype and gives a guideline for the routine pathological practice at present for the diagnostics of DLBCL treated by chemo-immunotherapy.

Szepesi Á. Molecular and histological features of diffuse large B-cell lymphoma. Hungarian Oncology 60:99-107, 2016

Keywords: diffuse large B-cell lymphoma, germinal center B cell, activated B cell, prognostic factor, biomarker

BEVEZETÉS

A diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) a felnőttkori limfómák közel 30%-át kitevő leggyakoribb limfoproliferatív megbetegedés. Az érett B-sejtekből kiinduló daganat viszonylag homogén morfológiai megjelenésű, diffúz növekedési mintázatot mutató nagy limfoid sejtek építik fel, míg biológiai viselkedését tekintve kifejezetten heterogén, az esetek közel 30%-a a jelenleg alkalmazott kemo-immunterápiával nem gyógyítható. A daganatok komplex biológiai, genetikai hátterének feltárásával párhuzamosan számos próbálkozás történt a célzott kezelésre is alkalmas betegcsoportok meghatározására. A 2008. évi WHO-klasszifikáció a DLBCL számos alcsoportját különíti el: a kiindulási szövetnek megfelelően szervspecifikus folyamatokat, immundeficienciával és vírusfertőzéssel járó formákat, illetve nehezen kezelhető CD20-negatív tumorokat és átmeneti entitásokat. A tumorok nagyobb része azonban jelenleg is ún. tovább nem osztályozható csoportba tartozik (DLBCL-not otherwise specified, NOS) (1., 2. táblázat) (1). A DLBCL-NOS esetek a kiindulási hely (40% extranodális, 60% nodális), a sejteredet, az immunfenotípus, a genetikai eltérések és a terápiára adott válasz tekintetében is meglehetősen heterogén csoportot képeznek. A következő áttekintés a már jól definiált klinikopatológiai entitások rövid jellemzése mellett a további csoportosítási szempontokat, illetve ezek lehetséges alkalmazásait tárgyalja a jelen gyakorlatban a legújabb kutatási eredmények fényében.

1. TÁBLÁZAT. A 2008. évi WHO-klasszifikációban szereplő, ismert immundeficienciával nem asszociált DLBCL-entitások legfontosabb morfológiai jellemzői és becsült gyakorisága

ENTITÁS	MORFOLÓGIAI JELLEGZETESSÉG	GYAKORISÁG (%)
DLBCL-NOS	diffúz, összefüggő nagy B-sejtes beszűrődés	~90
T-sejt-, hisztiocita-gazdag nagy B-sejtes limfóma	egyesével elszórt tumorsejtek reaktív T-sejt- és hisztiocita-gazdag háttérben	<10
Központi idegrendszeri primer DLBCL	perivaszkuláris megjelenés, központi idegrendszeren belüli terjedés	<1
Primer bőr DLBCL, leg-type	gyakori alsó lábszár kiindulás és disszemináció	<1
Primer mediasztinális nagy B-sejtes limfóma	alveoláris jellegű fibrózis, világos citoplazma	1
Intravaszkuláris nagy B-sejtes limfóma	intravaszkuláris terjedés	<1
ALK-pozitív nagy B-sejtes limfóma	immunoblasztos/plazmablasztos megjelenés CD20-negatív, ALK-pozitív fenotípussal	<0,1

DLBCL, diffúz nagy B-sejtes limfóma; NOS (not otherwise specified), másképp nem klasszifikálható; ALK, anapláziás limfóma kináz

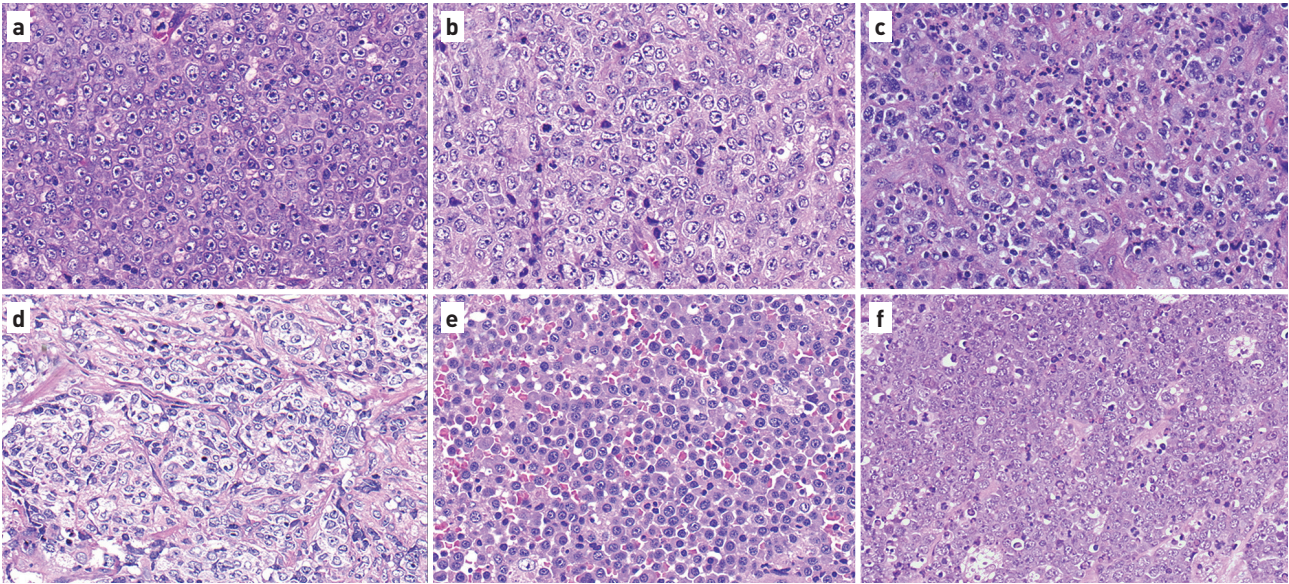
2. TÁBLÁZAT. A 2008. évi WHO-klasszifikációban szereplő, immundeficienciával és vírusfertőzéssel járó diffúz nagy B-sejtes limfómák*

ENTITÁS	VÍRUS	JELLEGZETESSÉG
Krónikus gyulladással asszociált DLBCL	EBV	piotórax melletti előfordulás (PAL)
Primer effuzionális limfóma	EBV, HHV8, HIV	plazmablasztos morfológia, CD20-negatív, CD138-pozitív fenotípus
HHV8-asszociált, multicentrikus Castleman-betegség mellett kialakuló nagy B-sejtes limfóma	EBV, HHV8, HIV	
Plazmablasztos limfóma	EBV, HIV	
Időskori EBV-pozitív DLBCL	EBV	extranodális kiindulás gyakori nekrozissal

*A teljes csoport összesen nem haladja meg az összes DLBCL-est 1-2%-át. DLBCL, diffúz nagy B-sejtes limfóma; EBV, Epstein-Barr-vírus; HHV8, humán herpeszvírus 8

MORFOLÓGIAI KÉP

A rutin hematoxin-eozin festett (H&E) metszetek mikroszkópos vizsgálata alapján meghatározott klasszikus DLBCL-morfológia centroblasztos, immunoblasztos és anaplasztikus megjelenésű lehet (1.a-c ábra), de jelentősebb prognosztikai információt a morfológiai kép általában nem nyújt. Típusos szövettani képe van a primer mediasztinális nagy B-sejtes limfómának (PMBCL), amely az anatómiai lokalizáció, a daganatos B-sejtek timuszeredetűnek és expressziós profiljának megfelelően egységes klinikopatológiai jellemzőket mutat. A viszonylag lokalizált, jó prognózisú limfóma a mediasztinális növekedés mellett a nagy B-sejtek jellegzetes, világos citoplazmája és az őket körülvevő alveoláris jellegű fibrózis alapján ismerhető fel (1.d ábra). A plazmablasztos differenciáció is jellegzetes szövettani képet mutat (1.e ábra), jelentőségét a gyakori CD20-negativitás adhatja (lásd később). Morfológiai alapon elkülöníthető entitás a DLBCL és a Burkitt-limfóma közötti átmeneti tulajdonságokat mutató limfóma (Burkitt cell lymphoma unclassified, BCLu), ezekre a centroblasztoknál kisebb sejtméret, a Burkitt-sejtekénél kevésbé monomorf megjelenés, illetve a magas proliferációs index mellett a kevésbé gyakori csillagos égbolt mintázat jellemző (1.f ábra). Az úgynevezett „double-hit” (DH) vagy „triple-hit” (TH) tumorokat (lásd később) is gyakran ilyen átmeneti morfológia jellemzi, és ezeket a daganatokat a 2016-ban megjelenő frissített WHO-klasszifikáció már külön csoportba is sorolja (2). Az alacsony malignitású B-sejtes limfómák transzformációja során kialakuló másodlagos DLBCL tumorok szövettani megjelenés tekintetében hasonlóak a *de novo* DLBCL-NOS csoporthoz, felismerésük az anamnézis vagy a biopsziás mintában megjelenő kissejtes komponens



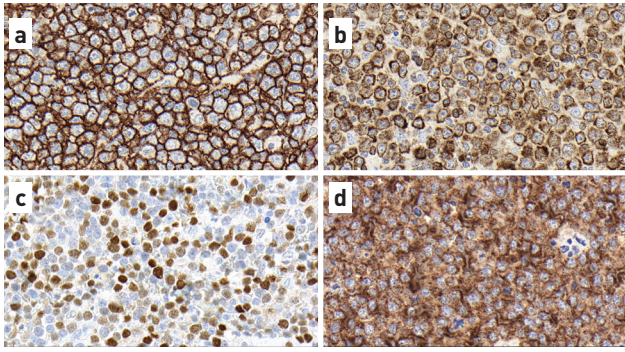
1. ÁBRA. Diffúz nagy B-sejtes limfómák morfológiai variánsai. a) DLBCL-NOS, centroblasztos altípus. A leggyakoribb morfológiai altípus, a 20-25 µm átmérőjű tumorsejtek kerek, vezikuláris sejtmagot és maghártáéhoz asszociált multiplex nukleoluszokat tartalmaznak, citoplazmájuk amfofil. b) DLBCL-NOS, immunoblasztos altípus. A 25-30 µm átmérőjű tumorsejtek ovális sejtmagot, egy nagy eozinofil centrális nukleoluszt tartalmaznak, citoplazmájuk bazofil. c) DLBCL-NOS, anaplasztikus altípus. A tumorsejtek kifejezetten nagyok, változatos megjelenésűek pleomorf sejtmagokkal és multiplex nukleoluszokkal, az ábrán számos multinukleált, Sternberg-Reed-szerű tumorsejttel. d) Primer mediasztinális nagy B-sejtes limfóma. Jellemző morfológiai kép látható alveoláris mintázatot mutató fibrotikus szeptumokkal körülvevett tumorsejtekkel, amelyek világos citoplazma mellett ovális vagy kerek sejtmagot és általában multiplex nukleoluszokat tartalmaznak. e) Plazmablasztos limfóma. Monomorf megjelenésű, plazmasejtes differenciációt mutató nagy tumorsejtek láthatóak, a sejtmagok kerek, a kromatin durva, rögös, a citoplazma bazofil. f) Burkitt-limfóma és DLBCL közötti átmeneti tulajdonságokat mutató, tovább nem klasszifikálható limfóma. A sejtek a centroblasztoknál általában kisebbek, a sejtmagok változatos megjelenésűek, kissé pleomorfak, a kromatin laza, multiplex kis nukleoluszok ismerhetőek fel, a citoplazma amfofil. A tumorsejtek között nagyszámú mitotikus és apoptotikus sejtforma látható

alapján lehetséges, a diagnózis feltétele a primer DLBCL-hez hasonlóan az összefüggő mezőt képező, diffúz megjelenésű nagy B-sejtes proliferáció.

SEJTEREDET

Az elmúlt években génextpressziós vizsgálatokkal (GEP) legalább három, sejteredet alapján elkülöníthető alcsoportot azonosítottak, amelyek eltérő genetikai háttér mellett prognosztikailag is különböztek. A germinatív centrum B-sejtekre (GCB) jellemző transzkripciós profillal és magas BCL6-expresszióval jellemezhető GCB-DLBCL-t szignifikánsan jobb összesített túlélés jellemzi, mint az aktivált B-sejt jellegű (ABC), a GC-éresen keresztülment és plazmablasztos differenciáció irányába elkötelezett B-sejtekre hasonlító ABC-DLBCL-t (3). A harmadik csoportot a mediasztinumban kialakuló, a GC-éresen keresztülment timikus B-sejtekből kiinduló, kedvező prognózisú PMBCL alkotja a Hodgkin-limfómához leginkább közel álló expressziós profillal (4). Számtalan próbálkozás történt a GEP által meghatározott sejteredet szerinti osztályozást kiváltó, a mindennapi gyakorlatban rendelkezésre álló formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetszövetmintán (FFPET) is kivitelezhető módszer kidolgozására. A morfológiai kép kismértékben irányadó: a centroblasztos daganatok gyakrabban GCB, míg az immunoblasztos folyamatok inkább

ABC jellegűek, de a morfológiai alapon elkülönített csoportok túlélése nem tér el szignifikánsan. Pontosabb meghatározást tesznek lehetővé az immunhisztokémiai (IH) algoritmusok. A klasszikus Hans-algoritmus (5) három marker (CD10, BCL6 és MUM1) kimutatásán alapul, amelyek a rituximabmal kiegészített kemo-immunterápia esetén már nem határoznak meg eltérő prognosztikai csoportokat. További markerek (LMO2, FOXP1, GCET1) bevonásával meghatározott betegcsoportok a GEP alapján elkülönített GCB és ABC csoportokkal 88-92% körüli korrelációt mutattak, vagyis IH módszerrel az esetek kb. 10%-a nem a sejteredetnek megfelelő csoportba került (6, 7). A legújabb adatok alapján úgy tűnik, hogy a prognózissal megfelelően korreláló, reprodukálható immunhisztokémiai módszer az ABC-eredetű tumorok elkülönítésére nincsen (8-10). Bebizonyosodott, hogy megfelelő pontosságú kvantitatív mRNS-meghatározásra az FFPET is alkalmas, így a Leukémia/Limfóma Molekuláris Profil Projekt keretében kidolgoztak egy 20 gén expressziójának meghatározásán alapuló ún. Lymph2Cx módszert, amelynek eredménye 95% feletti egyezést mutatott az eredeti GEP-alapú GCB/ABC besorolással (11), majd ezt nagyszámú betegcsoporton is validálták. A módszer a még mindig legfontosabb klinikai prognosztikai markertől, a nemzetközi prognosztikai indextől (IPI) és az IH módszerrel meghatározott BCL2/C-MYC kettős



2. ÁBRA. DLBCL fenotípus meghatározása immunhisztokémiai módszerrel. a) Centroblastos DLBCL erős CD20-membránpozitivitással. b) DLBCL-NOS, erős citoplazmatikus BCL2-pozitivitással. c) DLBCL-NOS, a sejtek kb. 30%-ában magi C-MYC-expresszióval. d) ALK-pozitív DLBCL, a tumorsejtekben citoplazmatikus ALK-fehérje-expresszió látható

pozitív fenotípustól (lásd később) is független prognosztikai csoportosítást eredményezett [12]. A jelen gyakorlatban tehát a fehérjeszintű vizsgálatok csak korlátozottan alkalmazhatók a sejteredet meghatározására, bizonyos immunhisztokémiai profil ismerete azonban továbbra is irányadó, így a CD10-pozitív daganatok 95%-a GCB-eredetű [13], a MUM1-expresszió megjelenése a BCL6- és a CD10-negativitás mellett egyértelműen az ABC irányú differenciálódás jele.

FENOTÍPUS

A következőkben a rutin patológiai gyakorlatban immunhisztokémiai módszerrel kimutatható diagnosztikai és prognosztikai markerek jelentőségét tárgyaljuk (3. táblázat).

CD20

A DLBCL-esetek többsége az érett B-sejtekhez hasonlóan CD20-pozitív (2.a ábra). A CD20-negatív DLBCL általában plazmablaszt irányú differenciációt mutat, gyakran csökkent immunitású betegekben alakul ki és krónikus vírusfertőzéssel társul. Az ide tartozó DLBCL-esetek nagy része négy WHO-entitásba sorolható (2. táblázat), de ritkán a DLBCL-NOS csoportban és az átmeneti tumorok között is előfordulhat. Klinikailag a kifejezetten agresszív viselkedés, a kemoterápiával szembeni gyakori rezisztencia és az anti-CD20 immunterápiára való alkalmatlanság jellemzi őket [14]. A diagnosztikai algoritmusban CD20-negativitás mellett a CD79A és PAX5 expressziója igazolhatja a B-sejt-eredetet. A plazmasejtes markerek kifejeződése, CD38-, CD138- és MUM1-expresszió is gyakori.

CD5

A sejt felszíni CD5-expresszió a kis limfocitás limfóma/krónikus limfocitás leukémia (SLL/CLL) transzformációja során kialakuló másodlagos DLBCL és a köpenysejtes limfómák mellett a primer DLBCL-esetek kb. 10%-ánál fordul elő, ezek

a WHO-klasszifikációban a DLBCL-NOS csoportban szerepelnek. A legújabb GEP-vizsgálatok eredménye alapján ezek egységesen a rosszabb prognózisú ABC csoporthoz tartoznak. A CD5⁺ ABC DLBCL mintázat számos olyan gént azonosít, amelyek idegrendszeri komponenseket kódolnak, illetve neurológiai funkciókkal állnak kapcsolatban, így magyarázatul szolgálhatnak a gyakran észlelt központi idegrendszeri (KIR) relapszusra [15]. A 2016-os frissített WHO-klasszifikációban provizórikus entitás a nagy B-sejtes limfóma IRF4-transzlokációval, amely szintén gyakran CD5-pozitív, de sejteredet alapján a GCB csoportba tartozik és kifejezetten jó a prognózisa [2].

Ki67

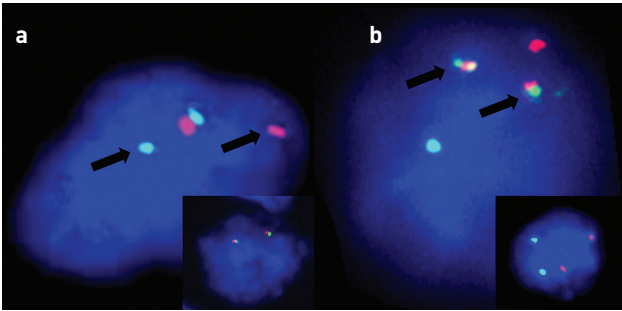
A magas Ki67-index prognosztikai jelentősége kérdéses, bár a vizsgálatok többsége csökkent túlélést igazol (60–75% közötti küszöbérték) [16]. Gyakorlati szempontból a Ki67⁺ tumorsejtek magas, 80% feletti aránya fokozott C-MYC-aktivitásra utalhat, így ezekben az esetekben ajánlott a C-MYC gén FISH-vizsgálata (lásd később).

BCL2

A DLBCL-NOS tumorok kb. 25-50%-a expresszálja a BCL2 fehérjét (a pozitivitás küszöbértéke 50-75%) (2.b ábra) [3]. A BCL2 antiapoptotikus hatása miatt felelőssé tehető a kemoterápia iránti rezisztenciáért, de a különböző genetikai háttérrel rendelkező daganatokban eltérő a jelentősége: fokozott expressziója a GCB tumorokban általában a BCL2/IgH transzlokáció eredménye, és nem befolyásolja a betegség kimenetelét, míg ABC típusú daganatokban a fokozott fehérjekifejeződés háttérében gyakoribb a génamplifikáció vagy az NFkappaB jelátviteli út vonal aktivációja, és ebben az esetben jelentősen rontja a betegség kimenetelét [17, 18].

C-MYC

A DLBCL-NOS csoportban a Burkitt-limfómához hasonlóan a C-MYC génaviváció háttérében az esetek 5–15%-ában kromoszómatranszlokáció áll. Ennél magasabb arányú, 30–50%-os a C-MYC-transzlokáció előfordulása az átmeneti tumorokban (BCLu). A korábban egyöntetűen rossz prognosztikai tényezőnek tekintett genetikai eltérés a legújabb eredmények alapján csak abban az esetben jár együtt rosszabb túléléssel, ha a transzlokációs partner valamelyik immunoglobulín gén (nehéz- vagy könnyűlánc), és ez magasabb fehérjeexpressziót is eredményez a C-MYC/nem-Ig transzlokációkhoz képest [19, 20]. Ezek az esetek csak citogenetikai vizsgálattal, a gyakorlatban FFPET mintán FISH-vizsgálattal, Ig/C-MYC transzlokációs próbák segítségével azonosíthatók (3.b ábra) [21]. A C-MYC fehérje fokozott magi expressziója (2.c ábra) azonban más molekuláris mechanizmussal is kialakulhat, és önmagában nem befolyásolja a betegség kimenetelét. Az utóbbi években megjelent eredmények a fehérjeexpresszió jelentős prognosztikai szerepét a BCL2 fehérjével együttes kifejeződés esetén igazolják. A C-MYC/BCL2 kettős pozitív daganatok gyakorisága 20–35% a DLBCL-NOS csoportban



3. ÁBRA. FISH-technika. a) DLBCL-NOS, t(C-MYC;IgH)-val. Break apart FISH-próba a C-MYC gén törését mutatja: egy piros és egy zöld szignál szétvált egymástól (nyilak), míg az érintetlen másik génnek megfelelően a két szignál egymás mellett helyezkedik el. A jobb alsó sarokban a negatív kontroll. b) DLBCL-NOS, transzlokációs-specifikus IgH/C-MYC FISH-próbával két sárga transzlokációs szignál jelent meg (nyilak). A jobb alsó sarokban a negatív kontroll

(küszöbértékek: MYC \geq 40%, BCL2 \geq 50%), és IPI-től, valamint sejteredettől függetlenül rosszabb prognózist mutatnak (5 éves túlélési arány az ABC DLBCL-hez hasonlóan 50% körüli [2, 19]). A gyakorlatban a C-MYC fehérje expressziója IH módszerrel könnyen vizsgálható, és a kettős pozitív esetek a 2016-os frissített WHO-klasszifikációban külön prognosztikai alcsoportban szerepelnek. A nehezen reprodukálható immunhisztokémiai eredmény miatt a C-MYC/BCL2 kettős pozitívítás figyelembevétele a terápiás döntéshozatalban jelenleg még nem ajánlott [21]. Az úgynevezett „double-hit” limfómák szintén ilyen kettős pozitív fenotípust mutatnak (lásd később), azonban a széles határok között változó C-MYC-expresszió miatt a C-MYC IH szűrésükre nem alkalmas [21].

p53

A limfomagenezisnek feltehetően előfeltétele a p53 által szabályozott apoptózis-útvonal kóros működése akár az antiapoptotikus fehérjék túlzott expresszióján keresztül, akár a TP53 gén mutációja, deléciója, illetve epigenetikai módosítása révén vagy a jelátvitel későbbi pontján levő fehérjék mutációi miatt [22, 23]. A DLBCL-NOS tumorok kb. 20%-ában mutatható ki a TP53 gén mutációja, ami gyakran a fehérje fokozott magi expressziójával jár, de az összes eset csak DNS-szekvenancia-vizsgálattal azonosítható [24].

ALK

Az anapláziás limfóma kináz (ALK) fehérjére pozitív DLBCL külön WHO-entitást képez. A fokozott ALK-expresszió általában a clatrin (CLTC)-ALK transzlokáció eredménye, az ALK fehérje citoplazmatikus felhalmozódását eredményezi [2.d ábra], és a transzlokáció FISH-vizsgálattal is kimutatható.

GENOTÍPUS

Az újabb DNS-szekvenálási technikákkal (next generation sequencing, NGS) végzett kutatások vezettek ahhoz a felismeréshez, hogy a DLBCL-esetekben a teljes genom kódoló

régióiban, más B-sejtes limfómákhoz képest jóval komplexebb genetikai eltérések alakulnak ki, amelyek száma esetenként 30-100 is lehet betegenként nagy változatosságot mutatva. A gyakoribb eltérések a nukleotidcsere és a kópiaszámvesztés, míg amplifikáció és transzlokáció ritkábban fordul elő. A limfomagenezis hátterében eltérő molekuláris mechanizmusok feltételezhetőek sejteredettől függően, bizonyos mutációk elsősorban a GCB, míg mások az ABC DLBCL, illetve a PMBCL sajátjai, de vannak sejteredettől független genetikai eltérések is [4. táblázat]. Az alábbiakban a fenti szerzett genetikai eltéréseket patomechanizmus alapján tárgyaljuk.

A hiszton/kromatin modifikációs enzimek eltérései

A kromatinátrendeződésért felelős enzimek mutációi a B-sejtek epigenetikai átprogramozása révén járulnak hozzá a limfomagenezishez. Sejtípustól függetlenül a DLBCL-esetek mintegy 35%-ában azonosítható CREB-kötő fehérje (CREBBP), ritkábban az EP300 inaktíváló mutációja vagy deléciója [25]. Ezek az enzimek acetiláción keresztül fokozzák a TP53 gén transzkripcióját, míg a BCL6 gént inaktíválják, így kiesésük a GC B-sejtekéknél az immunglobulin-génátrendeződés kapcsán kialakuló genetikai eltérésekkel szembeni fokozott toleranciát, genetikai instabilitást eredményez. Az MLL2 (mixed leukemia type 2) gén mutációja a DLBCL-esetek 30%-ában mutatható ki, a gén egy hiszton-metiltranszferáz kódol, amely tumorszuppresszorként működik [25]. GCB sejteredetthez kötött a polycomb represszor-2 komplex gén (EZH2) funkciófokozó mutációja a DLBCL-ek 22%-ában, amely génextpressziót gátló hiszton-metiltranszferáz kódol.

A BCL6 szabályozásának zavara

A B-sejtek terminális differenciációjához a BCL6 gén csendesítése szükséges, ennek zavara sokféle mechanizmussal jöhet létre, direkt (BCL6 géntanszlokáció, mutáció, az esetek 25%-a) és indirekt úton is (MEF2B serkentő aktivitásának fokozódása révén, az acetilációmédiált gátlás kiesése CREBBP-mutáció miatt, fehérjedegradáció gátlása FBX011-mutáció/deléció következtében, 25%).

Az immunválasz kikerülését eredményező genetikai eltérések

A citotoxikus immunválasz csökkenését eredményezheti a béta2-mikroglobulin vagy a HLA I expressziójának hiánya, a CD58 ligandum hiányában pedig az NK-sejt-mediált tumorlízis hiúsulhat meg.

A sejtípustól függő genetikai eltérések

A C-MYC és a BCL2 gének transzlokációja a GCB sejteredetű tumorokban fordul elő. Az ABC típusú DLBCL-t az NF-kappaB útvonal folyamatos aktivációja jellemzi, amely a B-sejt-receptor (BCR), a Toll-like receptor (IL-1R), illetve a CD40 receptorokon keresztül különböző mechanizmusokkal valósulhat meg: a CD79A és a CD79B fehérjéket kódoló gének

aktiváló mutációi (20%) mellett fontos szerepe lehet ebben a CBM komplexnek. A CBM komplex résztvevői a CARD11, a BCL10 és a MALT1, illetve az MYD88 fehérjék, amelyek aktiváló mutációi a BCR jelátviteli rendszer aktivációjához vezethetnek [26, 27]. Az NF-kappaB transzkripció faktor negatív szabályozója a TNFAIP3 gén által kódolt A20 fehérje, amelynek hiányában az ABC-DLBCL-esetek 30%-ban kimutatható, elhúzódó NF-kappaB-aktiváció alakulhat ki [28]. PMBCL-ben a folyamatosan aktív NF-kappaB jelátviteli út mellett számos eltérés a JAK/STAT útvonal fokozott aktivitását idézi elő.

A másodlagos DLBCL-re jellemző genetikai eltérések

Az alacsony malignitású B-sejtes limfómák szövettani transzformációja, a köpenysejtes limfómát kivéve, másodlagos DLBCL kialakulásához vezethet, amely leggyakrabban

follikuláris limfómánál (FL) fordul elő (a 10 éves kumulatív kockázat FL-nél 27%, CLL/SLL esetén 12%). A folyamat genetikai háttere CLL/SLL és FL esetében a legjobban feltárt. A CLL transzformációja, az ún. Richter-szindróma során 80%-ban azonos klón lineáris evolúciója vezet a magas malignitású tumor keletkezéséhez, tehát a DLBCL-sejtek a klonális evolúció végstádiumát jelentik, míg az esetek kb. 20%-a az eredeti tumortól független, *de novo* folyamat. Ezzel szemben az FL után megjelenő másodlagos DLBCL gyakorlatilag mindig valódi transzformációnak tekinthető, amely a közös tumorossejt nem lineáris, hanem ún. elágazódó klonális evolúciójának eredménye, tehát a genetikai eltérések a korai FL-ben és a DLBCL-ben csak részben közösek. A magas malignitású folyamat kialakulásáért nem egyetlen mutáció vagy egy közös mechanizmushoz köthető mutációk sorozata felelős, hanem különböző genetikai

3. TÁBLÁZAT. Diagnosztikai és prognosztikai patológiai és molekuláris módszerek DLBCL esetén

MÓDSZER	BIOMARKER	GYAKORISÁG %	ENTITÁS/BIOLÓGIAI JELLEMZŐ
Immunhisztokémia	CD5	9–10	CD5+ DLBCL
	CD138	5>	plazmablaszt irányú differenciáció, gyakran CD20-negatív
	ALK	1>	ALK+ DLBCL
	BCL6	61–87	GC-eredet/BCL6-aktíváció
	CD10	40	
	MUM1	38–42	sejteredetfüggő expresszió, ABC/GCB
	FOXP1	55–72	
	p53	20	komplex genetikai eltérés
	BCL2	50	antiapoptotikus hatás
	C-MYC	n. a.*	mitotikus hatás, C-MYC/Ig transzlokáció lehetősége >40%
	Ki67	>75% 50–60	proliferációs frakció
	FISH	C-MYC-transzlokáció	10
BCL2-transzlokáció/ amplifikáció		24–34	GCB/ABC sejteredet
BCL6-transzlokáció		35	sejteredet-független BCL6-aktiváció
<i>In situ</i> hibridizáció	EBV	9–14/30–100**	EBV-asszociált DLBCL-ek
	HHV8	1>	primer effuzionális limfóma
Szekvenálás***	CREBBP/EP300	35	sejteredet-független epigenetikus módosítás
	MLL2	30	
	MYD88	30	ABC-DLBCL, NF-κB-aktiváció
	EZH2	22	GCB DLBCL epigenetikus módosítás
	TP53	20	sejteredet-független genomstabilitás

*határértéktől függ, rosszul reprodukálható az értékelés. **előfordulási gyakoriság immunkompetens/immunszuppresszált betegekben, ***jelenleg nem rutinvizsgálat. ALK, anaplázias limfóma kináz; DLBCL, diffúz nagy B-sejtes limfóma; GC, germinatív centrum; GCB, germinatív centrum B-sejt; ABC, aktivált B-sejt

4. TÁBLÁZAT. Patomechanizmus és sejteredet alapján csoportosított fontosabb genetikai eltérések DLBCL-ben

PATOMECHANIZMUS	SEJTEREDET		
	GCB	ABC	PMBCL
NF-kappaB-aktiváció		CD79A/B-mutáció CARD11-mutáció MYD88-mutáció	REL-amplifikáció
BCL6 kóros szabályozása	BCL6-mutáció	BCL6-transzlokáció	
Prolifерáció/differenciáció	C-MYC-transzlokáció	CDKN2A/B-deléció	
Apoptózisgátlás	BCL2-transzlokáció	BCL2-amplifikáció	
Epigenetikus módosítás	EZH2-mutáció		JMJD2C-amplifikáció
		MLL2, CREBBP/EP300	
DNS-károsodásra adott kóros válasz	TP53-mutáció		TP53-mutáció
JAK/STAT-aktiváció			JAK2-amplifikáció
Immunválasz kikerülése		B2M/CD58-mutáció/deléció	PD-L1/PD-L2-amplifikáció

ABC, aktivált B-sejt; GCB, germinatív centrum B-sejt; PMBCL, primer mediasztinális nagy B-sejtes limfóma

eltérések kombinációja, amelyek leggyakrabban a DNS integritásáért és a sejtciklus szabályozásáért felelős géneket, így gyakorisági sorrendben a TP53, C-MYC és a CDKN2A/B géneket érintik [29].

MIKROKÖRNYEZET

A normális B-limfociták fejlődésük során a mikrokörnyezetet alkotó immun- és stromális sejtekkel pontosan összerendezett funkcionális kölcsönhatásban állnak, és ezektől való függésük a daganatos transzformációt követően is megmaradhat. A daganatsejtek szaporodását elősegítő kölcsönhatások mellett a gazdaszervezet tumorelles immunválaszát megvalósító immunsejtek képezik a betegség kimenetelét befolyásoló másik fontos mikrokörnyezeti tényezőt. Ezek prognosztikai szerepét igazolták azok a GEP-vizsgálatok, amelyek során jobb kimenetelű, ún. 1. típusú stromális mintázatot mutató, extracelluláris mátrix fehérjéket kódoló gének aktivációjával jellemezhető és rosszabb kimenetelű, ún. 2. típusú stromális mintázatot mutató, fokozott angiogenezissel jellemezhető DLBCL-alcsoportokat különítettek el [30], illetve a terápiarefrakter esetekben a mikrokörnyezetre jellemző génexpressziós mintázat is szignifikánsan eltért a kezelésre jól reagáló esetekétől [31]. Morfológiai és IH vizsgálatok is a tumorelles immunválasz prognosztikai jelentőségét igazolták a limfómasejtek HLA II-expressziója és az immunválaszt képviselő CD8⁺ citotoxikus T-sejtes

beszűrődés mértékének eltérései alapján [32, 33]. A citotoxikus T-sejtek aránya primer csont-DLBCL esetén is prognosztikai markernek bizonyult [34]. A rutin patológiai vizsgálatok során a mikrokörnyezet vizsgálatának jelenleg csak diagnosztikai szerepe van, pl. a reaktív immunsejtek és a tumorsejtek aránya alapján morfológiailag osztályozható entitás a T-sejt- és hisztiocitagazdag DLBCL, amely agresszív lefolyást mutat, és a molekuláris hátterét tekintve a noduláris, limfocita-predomináns a Hodgkin-limfómához áll közel. A legújabb vizsgálatok a REL gént kódoló 2p16.1 kromoszómaszakasz amplifikációját mutatták ki mindkét entitás 30%-ában [35].

A 2008. ÉVI WHO-KLASSZIFIKÁCIÓBAN SZEREPLŐ DLBCL-ALTÍPUSOK

Anatómiai lokalizáció alapján elkülöníthető primer DLBCL-entitások

Bizonyos daganatok a kialakulási helyükre jellemző, jellegzetes biológiai viselkedést mutatnak, így viszonylag homogén klinikopatológiai entitást képeznek. Ide tartoznak a primer központi idegrendszeri DLBCL, a bőrben jelentkező, ún. leg-type DLBCL, a primer csontlimfóma (a WHO-klasszifikációban jelenleg nem szerepel külön entitásként) és a PMBCL (1. táblázat). A daganatok többsége az ABC csoporthoz tartozik, általános fenotípus-jellemzőjük a CD10-negativitás, a BCL6- és a MUM1-pozitivitás [36, 37]. A PMBCL emellett gyakran mutat CD30-expressziót is.

Immundeficienciával társuló DLBCL

Az immunszuppresszió mellett kialakuló tumorok általános jellemzői a plazmablaszt irányú differenciáció, ezzel párhuzamosan a CD20-expresszió elvesztése és az Epstein–Barr-vírussal (EBV) mutatott gyakori asszociáció [2. táblázat]. Ide tartoznak a leggyakrabban humán immundeficiencia vírus (HIV) fertőzéshez társuló tumorok, amelyek közül a testüregekben szolid tumormasszát nem képző rendkívül ritka primer effuzionális limfóma (PEL) és a multicentrikus Castleman-betegséggel asszociált nagy B-sejtes limfóma az EBV mellett humán herpeszvírus 8 (HHV8) genomot is tartalmaznak (1). EBV-asszociált DLBCL a CD20-negatív plazmablasztos limfóma, amely morfológiailag nehezen elkülöníthető a plazmablasztos mielómától, és az ún. krónikus gyulladással asszociált DLBCL, amely elsősorban testüregekben alakul ki, és a leggyakoribb formája a pítóraxasszociált limfóma (PAL). A felsorolt entitások molekuláris háttere eltér a normális immunfunkcióval rendelkező betegekben kialakuló tumorokétól, feltehetően a csökkent immunvédekezés, a vírusinfekció és krónikus gyulladással kapcsolatos jelen lévő alternatív túlélési szignálok következtében, amelyek csökkentik a genetikai eltérések szerepét a kóros B-sejt-szaporodás hátterében (38). A HIV-infekcióhoz társuló limfómák közös jellegzetessége az EBV-indukált, igen intenzív angiogenezis (39).

CD20 negatív limfómák

Az előző csoportba tartozó entitások mellett a ritka ALK-pozitív DLBCL is mutathat CD20-negatív, morfológiailag immunoblasztos vagy plazmablasztos sejtképet. Ritkán a későbbiekben tárgyalt átmeneti tumorok és a tovább nem osztályozható DLBCL-NOS kategóriába tartozó limfómák között is előfordulhat immundeficiencia és egyértelmű plazmablasztos differenciáció nélkül is CD20-negativitás. Ezeket a daganatokat egységesen az agresszív biológiai viselkedés és a terápiarezisztencia jellemzi (14). A CD20-expresszió elvesztése másodlagosan, az anti-CD20 terápiát követően is észlelhető (40).

Pontosan nem klasszifikálható, átmeneti entitások

A morfológiai kép és az immunfenotípus szempontjából a DLBCL és a Hodgkin-limfóma, illetve a DLBCL és a Burkitt-limfóma közötti (BCLu), korábban szürke zóna limfómaként emlegetett esetek tartoznak ide. Ezek a daganatok a DLBCL-NOS csoportból már leválasztott entitások közül a legkevésbé homogén, morfológiai, fenotípus- és genotípus szinten is a legnehezebben definiálható csoportot képezik. A Burkitt-szerű, magas mitotikus aktivitást és legtöbbször GC-fenotípust mutató, komplex citogenetikai rendellenességet hordozó, és sokszor terápiarezisztens tumorok Burkitt- és

DLBCL-NOS limfómáktól való elkülönítése a jóval rövidebb, átlagosan 1,5 éves túlélés miatt fontos. A BCLu csoportban IH vizsgálattal 33–91% a C-MYC/BCL2 kettős pozitív tumorok aránya, és hasonlóan gyakori (32–78%) a C-MYC-transzlokáció mellett a BCL2 vagy a BCL6 gén (DH), illetve mindhárom gén transzlokációja (TH). Ezek a daganatok a 2016-os frissített klasszifikációban jól definiálható, külön csoportba kerültek, mint high-grade B-sejtes limfóma (HGBL) MYC- és BCL2- és/vagy BCL6-transzlokációval, míg a transzlokáció-negatív BCLu csoportba tartozó daganatok a HGBL NOS elnevezést kapták (2). A terápiás döntéshozatalhoz a citogenetikai vizsgálat alapvető fontosságú, és a C-MYC IH nem alkalmas minden esetben kiszűrésére (a C-MYC fehérje expressziója az esetek 30–40%-ában <50%) (21). A metafázis-citogenetika gyakorlati szempontból nehezen kivitelezhető, friss vizsgálati anyagot igényel, és nem is azonosít minden transzlokációt (41), míg FISH-vizsgálat a FFPE-m-ből is, de keneten vagy lenyomaton is könnyen végezhető (42). A „break apart”, törésre specifikus próbák a legérzékenyebbek a transzlokáció kimutatásában (3.a ábra). A legújabb eredmények arra utalnak, hogy a transzlokációs partner nem csupán az izolált C-MYC-transzlokációt tartalmazó tumoroknál, hanem a DH és TH tumoroknál is befolyásolja a betegség kimenetelét, kizárólag a C-MYC/Ig transzlokációnak van negatív prognosztikai hatása (19). Ezen eredmények alapján C-MYC-transzlokáció esetén a C-MYC/Ig specifikus próbákkal történő FISH-vizsgálat is ajánlott (3.b ábra, 3. táblázat).

ÖSSZEFOGLALÁS

Biopsziás mintákon a mindennapi gyakorlatban jelenleg alkalmazott, diagnosztikai, illetve terápiát befolyásoló legfontosabb biomarkereket a 3. táblázatban tüntettük fel. Párhuzamosan sejtfelszíni (CD20, CD5, CD138), citoplazmatikus (CD10, BCL2, CD30, ALK) és magi fehérjék (MUM1/IRF4, p53, BCL6, C-MYC, FOXP1) IH-kimutatása mellett a genetikai eltérések a rutin gyakorlatban FISH-technikával vizsgálhatóak céltartan (C-MYC, BCL2, BCL6, MUM1/IRF4 transzlokációja/amplifikációja), és jelenleg csak kutatási, klinikai vizsgálatok keretein belül céltartan szekvenálással (EZH2, MLL, CREBBP, MYD88), illetve a már említett, az onkogén jelátviteli pályák aktivitását jelző foszforilált fehérjék kimutatásával (pSTAT, pAKT, pERK). Az újabb klinikai vizsgálatok során szükség lesz számos biomarker párhuzamos meghatározására adott tumorsejt-populáción. A többféle biomarkert kifejező daganatokban a későbbiekben a megfelelő kezelési algoritmusok kidolgozása lesz a cél, azonban az első lépés az, hogy a releváns biomarkerek meghatározása minél szélesebb körben történjen meg a klinikai vizsgálatok keretében.

IRODALOM

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2008
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 pii: blood-2016-01-643569
3. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503–511, 2000
4. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. 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* 198:851–862, 2003
5. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103:275–282, 2004
6. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 15:5494–5502, 2009
7. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* 29:200–207, 2011
8. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 19:6686–6695, 2013
9. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 117:4836–4843, 2011
10. Ott MM, Horn H, Kaufmann M, et al. The Hans classifier does not predict outcome in diffuse large B cell lymphoma in a large multicenter retrospective analysis of R-CHOP treated patients. *Leuk Res* 36:544–545, 2012
11. Scott DW, Wright GW, Williams PM, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 123:1214–1217, 2014
12. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol* 33:2848–2856, 2015
13. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia* 26:2103–2113, 2012
14. Castillo JJ, Chavez JC, Hernandez-Ilizaliturri FJ, et al. CD20-negative diffuse large B-cell lymphomas: biology and emerging therapeutic options. *Expert Rev Hematol* 8:343–354, 2015
15. Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, et al. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphomas supervised by CD5 expression. *Int J Hematol* 102:188–194, 2015
16. Salles G, de Jong D, Xie W, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* 117:7070–7078, 2011
17. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, et al. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J Clin Oncol* 27:5573–5579, 2009
18. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24:961–968, 2006
19. Copie-Bergman C, Cuilliere-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 126:2466–2474, 2015
20. Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur J Haematol* 92:42–48, 2014
21. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014:90–99, 2014
22. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, et al. Integrative analysis reveals an outcome-associated and targetable pattern of p53 and cell cycle deregulation in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 22:359–372, 2012
23. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* 119:3668–3683, 2012
24. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 110:4396–4405, 2007
25. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476:298–303, 2011
26. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 319:1676–1679, 2008
27. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470:115–119, 2011
28. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459:712–716, 2009
29. Rossi D. XIII. Molecular pathogenesis of transformed lymphomas. *Hematol Oncol* 33(Suppl 1):70–74, 2015
30. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 359:2313–2323, 2008
31. Linderth J, Eden P, Ehinger M, et al. Genes associated with the tumour microenvironment are differentially expressed in cured versus primary chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141:423–432, 2008
32. Rimsza LM, Roberts RA, Campo E, et al. Loss of major histocompatibility class II expression in non-immune-privileged site diffuse large B-cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions. *Blood* 107:1101–1107, 2006
33. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 103:4251–4258, 2004
34. Rajnai H, Heyning FH, Koens L, et al. The density of CD8+ T-cell infiltration and expression of BCL2 predicts outcome of primary diffuse large B-cell lymphoma of bone. *Virchows Arch* 464:229–239, 2014
35. Hartmann S, Doring C, Vucic E, et al. Array comparative genomic hybridization reveals similarities between nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma. *Br J Haematol* 169:415–422, 2015
36. Martinez A, Ponzoni M, Agostinelli C, et al. Primary bone marrow lymphoma: an uncommon extranodal presentation of aggressive non-hodgkin lymphomas. *Am J Surg Pathol* 36:296–304, 2012
37. Sung CO, Kim SC, Karnan S, et al. Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 117:1291–1300, 2011
38. Capello D, Gloghini A, Martini M, et al. Mutations of CD79A, CD79B and EZH2 genes in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 152:777–780, 2011
39. Liapis K, Clear A, Owen A, et al. The microenvironment of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma provides insight into the pathophysiology and indicates possible therapeutic strategies. *Blood* 122:424–433, 2013
40. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 113:4885–4893, 2009
41. Landsburg DJ, Nasta SD, Svoboda J, et al. 'Double-Hit' cytogenetic status may not be predicted by baseline clinical/pathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br J Haematol* 166:369–374, 2014
42. Foot NJ, Dunn RG, Geoghegan H, et al. Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *J Clin Pathol* 64:802–808, 2011