

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Lékařská fakulta**



**Analýza imunohistochemického expresního profilu konkrétních lymfoproliferativních onemocnění  
a jeho klinicko-patologický význam**

**Dizertační práce doktorandského studia**

**Olomouc 2014**

**MUDr. Patrik Flodr**

**Analýza imunohistochemického expresního profilu konkrétních lymfoproliferativních onemocnění  
a jeho klinicko-patologický význam**

**Dizertační práce doktorandského studia**

**MUDr. Patrik Flodr**

**Školitel: doc. MUDr. Martin Tichý, CSc.**

**Ústav klinické a molekulární patologie**

**Laboratoř molekulární patologie**

**Lékařská fakulta Univerzity Palackého**

**Olomouc, Česká republika**

**Obor studia: Patologická anatomie a soudní lékařství**

**Olomouc 2014**

**Prohlášení:**

Tímto prohlašuji, že jsem provedl veškerou vykonanou práci obsaženou v této dizertační práci, pokud není uvedeno níže jinak, a uvedl jsem veškerou použitou literaturu a jiné prameny.

Dizertační práce obsahuje výsledky, které byly získány v kooperaci s těmito kolegy: prof. MUDr. T. Papajík, PhD. (klinická data vstupující do studie), MUDr. Z. Kubová (klinická data vstupující do studie), Mgr. E. Sedláková (laboratoř imunohistochemie), Mgr. L. Radová, PhD. (statistická analýza dat).

Poděkování za odborné příspěvky k vědeckému řešení dizertačního tématu je obsaženo v této práci (kapitola 10).

Olomouc, červen 2014

MUDr. Patrik Flodr

## Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Lymfoproliferativní onemocnění</b>	<b>6</b>
1.1.1 Lymfoidní neoplazie a klasifikace, historický kontext a současnost	6
1.1.2 Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL)	10
<b>1.2 Proteomika DLBCL</b>	<b>11</b>
1.2.1 Proteomický profil	11
1.2.1.1 CD20	11
1.2.1.2 Bcl-6	11
1.2.1.3 CD10	12
1.2.1.4 Bcl-2	12
1.2.1.5 CD30	13
1.2.1.6 MUM1/IRF4	13
1.2.1.7 c-Myc	13
1.2.2 NFκB signální dráha	14
<b>1.3 Transkriptomika DLBCL</b>	<b>15</b>
1.3.1 Exprese microRNA	15
<b>1.4 Genomika DLBCL</b>	<b>15</b>
1.4.1 Genový expresní profil DLBCL	15
1.4.2 Klonální přestavba TCR a Ig	16
1.4.3 Somatická hypermutace u „normální“ – fyziologické a neoplasticky transformované B-lymfoidní buňky	19
<b>1.5 Proces nazývaný „homing“ lymfoidních buněk</b>	<b>21</b>
1.5.1 Migrace lymfoidních buněk	22
1.5.2 Molekulární podstata diseminace lymfomů	26
<b>2. Cíl projektu</b>	<b>30</b>
<b>2.1. Pracovní hypotéza</b>	<b>30</b>
<b>3. Materiál a metody</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Materiál a metody</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Metoda nepřímé imunohistochemie</b>	<b>34</b>
<b>4. Výsledky studie</b>	<b>45</b>
<b>5. Diskuze</b>	<b>64</b>

<b>6. Nové vize, horizonty a konsekvence v potenciální terapii</b>	<b>71</b>
<b>6.1. Idiotypická vakcinace v léčbě B-lymfomů</b>	<b>71</b>
<b>7. Souhrn</b>	<b>71</b>
<b>8. Použité zkratky</b>	<b>74</b>
<b>9. Původní vědecké publikace, přehledové články, publikovaná abstrakta, postery</b>	<b>83</b>
<b>9.1. Původní vědecké publikace</b>	<b>83</b>
<b>9.2. Přehledové články</b>	<b>84</b>
<b>9.3. Publikovaná abstrakta</b>	<b>85</b>
<b>9.4. Postery</b>	<b>85</b>
<b>10. Poděkování</b>	<b>86</b>
<b>11. Reference</b>	<b>86</b>

## 1. Úvod

### 1.1. Lymfoproliferativní onemocnění

#### 1.1.1. Lymfoidní neoplazie a klasifikace, historický kontext a současnost

Prvopočátky klasifikace resp. hodnocení lymfoproliferativních onemocnění jsou datovány od první poloviny 19. století s pionýrskou prací sira Thomase Hodgkina a R. L. C. Virchowa a právě mezi následující druhou polovinou 19. století a první polovinou 20. století bylo popsáno mnoho odlišných typů lymfomů. Jeden z prvních pokusů o vytvoření klasifikace lymfomů byl návrh pánů Galla a F. B. Malloryho, nicméně klinická korelace byla vytvořena H. Rappaportem a byla založena pouze na morfologickém, architektonickém a cytologickém popisu a podobnosti vytvořených skupin. Teprve až v Londýně roku 1973 byl poprvé prezentován nový imunobiologický pohled na lymfoproliferativní onemocnění včetně dopadu na klasifikaci, a to navíc dvěma skupinami – z Kielu (Německo) pod vedením K. Lennerta (Kielská klasifikace) a z USA, která byla prezentována R. Lukesem a R. D. Collinsem. Tyto následně využívané klasifikace vedly ke konfuzím při současném využití v klinické praxi a proto již v roce 1980 vytvořil „National Health Institute“ (USA) návrh nového lymfomového projektu, který vedl ke konsenzuální klasifikaci nazvané „Working formulation for clinical usage“. Tato klasifikace umožnila a zahrнула porovnání obou dvou odlišných klasifikací Kielské a dle Lukese a Collinse a přiřadila klinický vývoj každého z popsaných typů lymfomů. První Kielská klasifikace byla navržena v roce 1978 K. Lennertem pod záštitou „European Lymphoma Club“ a byla novelizována v roce 1988 a následně v roce 1992. Kielská klasifikace dělila uvedené typy lymfomů na základě definice opírající se komplexně o anatomicko-klinické hledisko, o histogenetický původ z B nebo T buněk a o hodnocení velikosti neoplastických buněk vzhledem k velikosti histiocytární populace, kdy buňky větší než histiocyt jsou nazývány „transformovanými lymfomovými buňkami“. Během 80. let byla založena „International Lymphoma Study Group“ (ILSG), která vytvořila nové klasifikační schéma nazývané „REAL“ (Revised European American Lymphoma) klasifikací. Tato nová klasifikace využila též dělení jednotlivých lymfomových entit dle B a T buněčného původu, dle podobnosti morfologie k prekurzorové a maturované lymfoidní buňce. Nicméně v roce 1995 byla určena nová výkonná skupina pod vedením WHO, která vyzvala deset hematopatologů k předsedání deseti pracovním skupinám, jež měly za úkol vytvoření nového návrhu klasifikace hematologických onemocnění s tím, že k získání všeobecného konsenzu vznikající klasifikace byla umožněna širší diskuze s lékaři oboru hematologie a onkologie. Základem této nové klasifikace byla klasifikace Kielská a REAL s přesněji definovanými lymfomovými jednotkami a jejich variantami, které jsou poznatelné patologem, a navíc s nedílnou podporou molekulárního patologa či hematologa, tedy s dělením lymfoproliferativních

onemocnění založeném na morfologických, imunofenotypických a genotypických vlastnostech, které zároveň nesou klinický a/nebo biologický význam stanovené diagnózy. Současná WHO klasifikace hematologických onemocnění (2001, 2008) se základem těchto nových principů dělení (charakter architektiky růstu a histogeneze neoplastické lymfoidní buňky definované dle základní morfologie, imunofenotypu a molekulárně genetické analýzy) je obsažena v posledních dvou vydáních tzv. „WHO blue books“ pojednávajících o hematologických neoplaziích.

Lymfoproliferativní onemocnění vykazují v českém národním i celosvětovém měřítku stoupající incidenci. Velmi rychle se rozšiřující poznatky v biologii lymfomů otevírají nové možnosti optimalizovanější diagnostiky a léčby aplikovatelné na konkrétní případ hematologického onemocnění ("tailored therapy").

V týmu hematologických spolupracovníků hraje hematopatologické vyšetření pro stanovení diagnózy, prognózy a příp. i stagingu lymfoproliferativního onemocnění jednu z nezastupitelných rolí. Od počátku vzniku prvních klasifikací maligních hematologických onemocnění se postupně morfologický a klinický náhled sdružuje v komplexní biologický obraz s použitím metod molekulární patologie, který umožňuje kritický pohled na optimalizaci jak diagnózy, tak i prognózy a predikci konkrétního onemocnění [1-6,18]. V současné době využívaná stratifikovaná klasifikace lymfoproliferativních onemocnění [WHO 2008] pohlíží na maligní hematologická onemocnění ve výše uvedeném kontextu a nese významný prognostický potenciál [1,2,4].

Detekce imunohistochemické exprese proteinů rodiny NF-kappaB včetně topografie exprese je jedním z možných faktorů s prognostickým a prediktivním významem u hematologických malignit [7,8,10,18, 21]. K rodině proteinů NF-kappaB náleží p50/p105, p65/RelA, c-rel, RelB a p52/p100, které jsou přítomné v cytoplasmě ve formě neaktivních homodimerů a heterodimerů. Po odštěpení molekuly inhibitoru označovaného I-kappaB jeho fosforylací "up-stream" aktivovanou kinázou IKK a degradací proteazomovou cestou dochází k dedimerizaci NF-kappaB proteinu a jeho jaderné translokaci, kde plní funkci transkripčního faktoru. Tato fáze jaderné aktivity transkripčního faktoru NF-kappaB není zcela jednoznačně objasněna, uvažuje se o modulaci apoptózy (regulací proteinů BCL-2 rodiny - BCL2, BCLXL a A1/Bfl-1, regulací rodiny inhibitorů apoptózy IAP - c-IAP1, c-IAP2, a XIAP a GADD45h) buněčného cyklu a modulaci mikroprostřední regulovanými proteiny [9-18].

V současné době nepřímá inhibice (stabilizací I-kappaB) konstitutivní aktivity NF-kappaB inhibitorem proteazomového komplexu (bortezomib) vykazuje aktivaci apoptotické kaskády a následně apoptózy a/nebo G1 zástavu buněčného cyklu, a je schválená (FDA) pro užití v terapii jednoho z celé šíře maligních hematologických onemocnění (mohočetný myelom).

Možnou další klíčovou roli iniciace a progresu lymfomogeneze hraje overexpresse "cluster" miR-17-92 s funkcí negativního regulátoru proapoptotického genu Bim. Cílená experimentální inhibice miR-

17-5p, miR-20a (součást "cluster" miR-17-92) vedla ke spuštění apoptózy neoplastické populace [3,5,19].

V komplexním biologickém procesu lymfomogeneze a našeho náhledu na něj jsme schopni dnešními dostupnými technikami, ať už rutinními nebo experimentálními, postupně poznávat rysy a charakter příslušných hematologických malignit na úrovni klinické, morfologické, imunobiologické a molekulárně biologické včetně jejich možné další evoluce. Současné poznání v této dynamicky se rozvíjející oblasti medicíny neslouží jen účelně pro nové klasifikační postupy, ale má vždy nedílný biologický kontext včetně aplikace získaných poznatků v cílené či cílenější terapii konkrétního lymfoproliferativního onemocnění. Pevně věřím, že i tato skromná práce napomůže rozšíření aplikace nových poznatků popř. metod v běžné praxi a podpoří další rozvoj zájmu nejen v oblasti lymfoproliferativních či hematologických onemocnění, ale i v širším spektru onemocnění onkologických.



Tab. 1 - WHO klasifikace DLBCL [Jaffe et al., 2008]

<b>1. Diffuse large B-cell lymphoma NOS</b>
<u>Common morphologic variants</u>
Centroblastic
Immunoblastic
Anaplastic and other rare morphologic variants
<u>Rare morphologic variants</u>
<u>Molecular subgroups</u>
Germinal centre B-cell-like (GCB)
Activated B-cell-like (ABC)
<u>Immunohistochemical subgroups</u>
CD5-positive DLBCL
Germinal centre B-cell-like (GCB)
Non-germinal centre B-cell-like (non-GCB)
<b>2. Diffuse large B-cell lymphoma subtypes</b>
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV-positive DLBCL of the elderly
<b>3. Other lymphomas of large B cells</b>
Primary mediastinal (thymic) LBCL
Intravascular large B-cell lymphoma
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
ALK-positive LBCL
Plasmablastic lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
Primary effusion lymphoma
<b>4. Borderline cases</b>
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

### 1.1.2. Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL)

Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL, tab. 1) tvoří přibližně 30-40% všech non-Hodgkinových lymphomů [Anon 1993, Armitage et al. 1998]. Medián věku v době diagnózy je 7. dekáda [Anon 1993, Armitage et al. 1998] s lehkou predominancí mužského pohlaví. Potenciální prognostické a prediktivní faktory u DLBCL mohou být získávány na podkladě klinických a morfologických poznatků včetně zásadního přispění imunohistologického a molekulárně biologického vyšetření [WHO 2001, 2008].

Histogeneticky vychází DLBCL z B-lymfocyty v různém stádiu svého předpokládaného původního fyziologického vývoje. Jeho základní morfologickou charakteristikou je dominující difuzní růst/infiltrace (formy nodulárního či mikronodulárního typu růstu však existují a jsou literárně popsány), přičemž neoplastická populace vykazuje typickou velikost jádra shodnou nebo větší s velikostí jádra makrofágu nebo více než dvojnásobnou oproti velikosti běžného lymfocyty (Fig. 1-3). DLBCL může vznikat *de novo* jako primární DLBCL nebo může být součástí progresu / transformace méně agresivní B-lymfoidní neoplazie jako sekundární DLBCL (B-CLL/SLL, FL, MZL, NLPHL). Přibližně 60% DLBCL je typicky nodálních lymfomů, zbývajících 40% je lokalizováno extranodálně, nejčastěji v oblasti GIT (žaludek, ileocekální přechod). Charakteristickým klinickým nálezem je rychle se zvětšující tumor, ať už v nodální či extranodální topografii, který může být doprovázen B-příznaky a také lokálními příznaky dle daného místa proliferace neoplazie. Do diferenciatně diagnostické rozvahy vždy spadají extramedulární leukémie, Burkittův lymfom a blastoidní varianta mantle cell lymfomu při převažující střední velikosti neoplastické populace.

Několik studií využilo výsledků imunohistologického profilu ke stratifikaci DLBCL [Barranas et al. 2002, Colomo et al. 2003, Linderoth et al. 2003, McClintock et al. 2003]. Navrženy byly dva zásadně odlišné genové expresní profily [Alizadeh et al. 2000, Rosenwald et al. 2002], které dělí DLBCL v prognosticky signifikantní podskupiny a to v „Germinal centre B-cell-like“ (GCB) a „Activated B-cell-like“ (ABC) podskupinu. Očekávané 5-leté celkové přežití (OS) ve skupině GCB a ABC je přibližně 70%, respektive 39% [WHO 2001].

První publikace popisující NFκB signální dráhu pochází z roku 1986 [Sen et al. 1986]. Tato signální dráha zahrnuje rodinu proteinů s funkcí transkripčního faktoru (RelA, RelB, c-Rel, p105, p100, p50, p52) s důležitou úlohou v proliferační, antiapoptické aktivitě a diferenciaci buňky. NFκB signální dráha je aktivována celou řadou podnětů, zahrnující i viry a bakterie, a je považována za centrální mediátor imunitní reakce a kontroluje expresi mnoha zánětlivých cytokinů, chemokinů, imunitních receptorů povrchových adhezních molekul. NFκB signální dráha reguluje přežívání fyziologického a

neoplasticky transformovaného B-lymfocyty kontrolou exprese genů buněčné smrti [Karin et al. 2002, Karin et al. 2002]. Konstitutivní aktivace NFκB signální dráhy nepochybně přispívá k lymfomogenezi DLBCL.

## **1.2. Proteomika DLBCL**

### **1.2.1. Proteomický profil**

#### **1.2.1.1. CD20**

B-lymfocytární antigen CD20 (cluster of differentiation 20) je aktivovaný, glykosylovaný fosfoprotein, který je přítomen na povrchu B-lymfocytů od stádia pro-B buněk (CD45R a CD117 pozitivní populace) a jehož koncentrace se následně zvyšuje až do stádia maturované (periferní) B-buňky. Protein CD20 je kódován genem MS4A1 na chromozomu 11q12 a je (trans)membránovým a povrchovým proteinem, který se účastní diferenciaci B-lymfocyty v plazmocyty. CD20 je exprimován pouze na B-lymfoidní populaci od pozdního stádia pro-B buněk až po stádium paměťových B-buněk a není tedy detekován na buňkách časného stádia pro-B lymfocytů a na plazmablastech či plazmocytech. Není známý přirozený ligand tohoto proteinu, který má pravděpodobnou funkci kalciového kanálu. Protein CD20 se účastní B-imunitní odpovědi proti T-nezávislým antigenům. CD20 je exprimován u celého spektra B-lymfoidních neoplazií (histogeneticky vycházející z B-lymfocytů), může však být downregulován a detekován pouze v menší části populace, v nižší intenzitě nebo kompletně negativní. V takovém případě lze s úspěchem využít dalších „lineage“ specifických proteinů CD79a a PAX-5. Exprese CD20 může být též detekována u mnohočetného myelomu, cHL a maligního melanomu (neoplastické kmenové buňky melanomu).

#### **1.2.1.2. Bcl-6**

B-„cell“ lymfomový protein 6 (Bcl-6) je kódován genem BCL-6 a nese funkci transkripčního faktoru se sekvenčně specifickou represí transkripce a s modulací STAT dependentní odpovědi B-buněk na IL-4. Protein Bcl-6 je schopen interagovat s dalšími korepresorovými komplexy na inhibici transkripce. Izoforna s chybějícím exonem 7 je tvořena kratší formou proteinu Bcl-6, která postrádá doménu pro vazbu k DNA. Protein Bcl-6 je u DLBCL velice často translokován nebo podléhá hypermutaci. Běžně je jeho exprese detekována v germinálních centrech (GC) sekundárních lymfoidních folikulů a u lymfoproliferativních onemocnění, která jsou považována za histogeneticky vycházející z GC, jako je folikulární lymfom (FL), Burkittův lymfom (BL), část DLBCL a Hodgkinův lymfom s nodulární lymfocytární predominancí.

### 1.2.1.3. CD10

Protein CD10 (cluster of differentiation 10) nese několik synonym a je známý též jako neprilysin, membránová metaloendopeptidáza (MME), neutrální endopeptidáza (NEP), „common acute lymphoblastic leukemia antigen“ (CALLA) s funkcí zinek dependentní metaloproteázy kódované genem MME. CD10 je exprimován na celé řadě buněk – hematopoetických progenitorových nazývaných „Common Lymphoid Progenitors“, které mají schopnost diferencovat v T-buňky, B-buňky a NK-buňky, CD10 je exprimován na B-buňkách GC a u vývojových stádií „early“, pro- a pre-B lymfoidní buňky. Celá řada hematologických malignit vykazuje expresi tohoto proteinu, jako jsou lymfomy derivované z GC – FL, část DLBCL, Burkittův lymfom, akutní lymfoblastické leukémie (ALL), „hairy cell“ leukémie (přibližně 10%), angioimunoblastický T-lymfom, chronická myeloidní leukémie v blastické krizi (přibližně 90%) a část mnohočetného myelomu. Snížená aktivita nebo úplný deficit proteinu je spojen s depozicí amyloidu  $\beta$  a vývojem Alzheimerovy choroby. Exprese CD10 je běžně detekována u celé řady epitelových a mezenchymových neoplazií (světlobuněčný renální karcinom, uroteliální neoplazie, mucinózně cystické neoplazie pankreatu, atypický fibroxantom, endometriální stromální sarkom, leiomyosarkom, atd.).

### 1.2.1.4. Bcl-2

Protein B-„cell“ lymfomu 2 (Bcl-2) je kódován genem BCL2 na chromozomu 18 a je součástí rodiny regulačních proteinů účastnících se procesu apoptózy (anti- a pro-apoptotické proteiny). Konkrétně Bcl-2 nese funkci anti-apoptotického proteinu, je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a je považován za onkogen. Existují dvě izoformy tohoto proteinu (izoforma 1 a 2), které se liší schopností vázat proteiny BAK a BAD, a také nesou odlišnou antiapoptotickou aktivitu. Aberace genu BCL-2 jsou popsány v patogenezi celé řady neoplazií (karcinomy plic, prsní žlázy, prostatické žlázy, maligního melanomu) včetně lymfomů, např. FL, B-CLL, DLBCL. Patogenetický fúzní gen (BCL-2/IgVH) s typickou translokací t(14;18) je popsán u většiny FL a části DLBCL, dokonce i malé procento cirkulujících lymfoidních buněk v periferní krvi může nést tuto translokaci a ve většině případů se jedná o zdravé jedince bez známek lymfoproliferativního onemocnění. Nicméně porucha regulace procesu apoptózy na podkladě aberantního genu BCL-2/proteinu Bcl-2 je popsána i u neurodegenerativních a autoimunitních onemocněních. Exprese proteinu Bcl-2 je běžně vyjádřena v plášťové zóně sekundárních lymfoidních folikulů a ve frakci nenádorových T-lymfocytů lymfatické uzliny. Exprese Bcl-2 je detekována u přibližně 30-60% DLBCL a častěji u nodálních než extranodálních forem [de Leval et al., 2003]. Kromě výše popsané translokace je dalším mechanismem overexprese genu Bcl-2 jeho amplifikace.

#### **1.2.1.5. CD30**

Protein CD30 je membránovým proteinem spadající pod rodinu receptoru pro „tumour necrosis factor“ (TNFR) se synonymem TNFRSF8, který je exprimován na aktivovaných B a T buňkách a jsou popsány jeho dvě izoformy. Ligandy TRAF1-3 a TRAF5 interagují s tímto receptorem s následnou aktivací signální dráhy NFκB. CD30 je pozitivním regulátorem apoptózy, u autoreaktivních CD8+ T-lymfocytů vykazuje snížení proliferačního potenciálu. Protein CD30 je detekován u části DLBCL, anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALCL), cHL a také u nelymfoidních neoplazií, např. embryonálního karcinomu.

#### **1.2.1.6. MUM1/IRF4**

MUM1/IRF4 protein je „interferon regulatory factor 4“, který je kódován genem IRF4. Nese funkci transkripčního faktoru, který se podílí na maturaci B a T lymfoidní populace. Běžně je detekován v B-lymfocytech vycházejících z GC, plazmocytech a frakci T-lymfocytů. Část DLBCL, mnohočetný myelom a proliferační centra B-CLL/SLL vykazují expresi tohoto proteinu. Malé procento Bcl-6 negativních B-lymfoidních buněk vycházejících z GC vykazuje pozitivitu MUM1/IRF4 a tyto buňky se nacházejí v apikální části světlé zóny germinálního centra. Expresí MUM1/IRF4 poukazuje na histogenezu DLBCL z B-buněk pozdně germinálních „late-GC“ nebo postgerminálních „post-GC“. Genový expresní profil ABC subtypu DLBCL je spojen s expresí MUM1/IRF4.

#### **1.2.1.7. c-Myc**

C-Myc protein náleží k rodině Myc proteinů s regulační funkcí transkripčních faktorů (c-Myc, n-Myc, l-Myc), mRNA Myc obsahuje IRES (internal ribosome entry system) umožňující translaci RNA v protein a to v případě, pokud je 5'-dependentní translace inhibována, např. při virové infekci dané buňky. Myc geny jsou lokalizovány na 8. chromozomu a předpokládá se, že ovlivňují nejméně 15% všech genů genomu vazbou na „Enhancer Box sequences“ (E-boxes) s následným navázáním histonových acetyltransferáz (HAT's), čímž ovlivňuje acetylaci histonů a celkovou chromatinovou strukturu. Nicméně může hrát i roli transkripčního represoru při vazbě na Miz-1 transkripční faktor a odstraňování p300 koaktivátoru. Konstitutivní exprese Myc proteinů vede k neregulované expresi dalších genů/proteinů, z nichž se část účastní buněčné proliferace (zvyšuje expresi cyklinů a snižuje expresi p21), apoptózy (snižuje expresi Bcl-2) a buněčného růstu (zvyšuje expresi rRNA). Myc gen byl poprvé objeven u Burkittova lymfomu a zde vykazuje typickou translokaci t(8;14) se vznikem fúzního genu C-Myc/IgVH. Overexpresí Myc podporuje genovou amplifikaci pravděpodobně pomocí DNA overreplikace. Myc náleží k silným protoonkogenům a je velmi často zvýšeně exprimován u celé řady dalších nelymfomových neoplazií (děložního čípku, tlustého střeva, prsní žlázy, žaludku, plic).

Cytoplasmatická forma Myc proteinu tzv. Myc-nick vzniká částečnou proteolýzou c-Myc a n-Myc proteinu (proteolýza je konstitutivní, indukovatelná a umožněna kalpainy) a má vliv na morfologii buňky současně popsanou acetylací  $\alpha$ -tubulinu. Zvýšená exprese Myc-nick proteinu urychluje terminální diferenciaci dané buňky.

### 1.2.2. NF $\kappa$ B signální dráha

Rodina proteinů NF $\kappa$ B signální dráhy s funkcí transkripčních faktorů je cíleně studována již více než dvě desetky let. NF $\kappa$ B proteiny jsou aktivovatelné transkripční faktory, které hrají důležitou roli v regulaci okamžitých krátkodobých a postupně se rozvíjejících dlouhodobých adaptačních buněčných procesů, které se řadí k environmentální plasticitě obecně. NF $\kappa$ B rodina reguluje expresi cytokinů, růstových faktorů a efektorových enzymů v odpovědi na vazbu celé řady ligandů na jejich příslušné receptory – T-buněčné receptory, B-buněčné receptory, TNFR, CD40, BAFFR, Lt $\beta$ R, Toll/IL-1R rodinu receptorů. A právě z důvodů probíhající komplexní aktivace signální dráhy NF $\kappa$ B (mnohočetné odlišné stimuly buňky s kontextuálně propojenou regulací v cytosolu a karyosolu včetně epigenetické modulace) je pochopení její integrace v daný jediněčný výsledek výzvou pro příslušný výzkumný tým zabývající se tímto tématem. NF $\kappa$ B rodina proteinů zahrnuje pět členů a to p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF $\kappa$ B1 (p50/p105), NF $\kappa$ B2 (p52/p100). NF $\kappa$ B proteiny jsou společně charakterizovány přítomností konzervativní části 300-AMK Rel homologní domény – RHD, která je lokalizovaná u N konce proteinu a je zodpovědná za dimerizaci proteinu, interakci s I $\kappa$ B a vazbu k DNA. Právě vazba k I $\kappa$ B zabraňuje monomerizaci a následné translokaci jednotlivých proteinů dráhy NF $\kappa$ B do jádra příslušné buňky a tímto i udržuje tuto signální dráhu inaktivní. NF $\kappa$ B signální dráha může být aktivována kanonickou (klasickou) a non-kanonickou (alternativní) cestou. Aktivace klasickou cestou zahrnuje fosforylaci I $\kappa$ B proteinu  $\beta$  podjednotkou I $\kappa$ B kinázového komplexu (IKK). Alternativní cesta aktivace je spojena s aktivací kinázového komplexu IKKalfa s fosforylací proteinu p100. Fosforylovaný I $\kappa$ B je polyubiquitinován ubiquitin ligázou a následně degradován proteazomovým komplexem. Z vazby uvolněné monomery NF $\kappa$ B jsou translokovány do jádra, kde se navážou na specifické sekvence v oblasti promotoru nebo enhanceru cílového regulovaného genu. V současné době je popsáno sedm členů I $\kappa$ B rodiny proteinů – I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , BCL-3, I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  a prekurzorové proteiny p100 and p105. I $\kappa$ B $\alpha$  a I $\kappa$ B $\beta$  jsou vázány k dimerům p65/p50 or p65/c-Rel a bylo zjištěno, že I $\kappa$ B proteiny maskují jen sekvenci pro jadernou lokalizaci (NLS) proteinu p65, kdežto NLS proteinu p50 zůstává odhalena a dostupná. Dostupná NLS proteinu p50 je svázána se sekvencí pro jaderný export (NES) v jádře, které jsou součástí I $\kappa$ B $\alpha$  a proteinu p65 vedoucí ke konstantní výměně I $\kappa$ B $\alpha$ /Nf  $\kappa$ B komplexů mezi jádrem a cytoplazmou, ačkoliv “steady-state“ lokalizace proteinů NF $\kappa$ B signální dráhy je vyjádřena v cytosolu. Popsaná dynamická rovnováha mezi cytoplasmatickou a

jadernou lokalizací proteinů NFκB je pozměněna degradací IκBα, která je doprovázena ztrátou IκB NES s konsekvenční expozicí NLS proteinu p65, a ta vede k dominující jaderné lokalizaci proteinů NFκB . Degradace IκB je citlivě regulovaný proces, který je iniciován specifickou fosforylací aktivovanou IKK.

### **1.3. Transkriptomika DLBCL**

#### **1.3.1. Exprese microRNA**

MicroRNA jsou skupinou krátkých nekódujících molekul RNA, které u eukaryontů regulují genovou expresi vazbou na komplementární cílovou sekvenci na 3'UTR dané mRNA. V současné době se předpokládá, že 10-30% celkové RNA hraje klíčovou regulační roli v celé řadě signálních drah zahrnující kontrolu hematopoiezy, diferenciaci buněk, časování ve vývoji (tkáň, orgánu, organismu), apoptózy, proliferace buněk a potažmo v dynamice celého vývoje organismu.

Potenciální význam microRNA molekul v onkogenezi je obecně založen na recentním poznatku, že většina lidské microRNA je lokalizována v oblastech genů, které jsou spojeny s potenciálním vývojem neoplazie a proto se lze i zcela hypoteticky domnívat, že dysfunkce těchto drobných regulačních molekul je běžnou součástí vývoje maligního onemocnění.

Současné studie zjistily, že microRNA expresní profil je možné využít pro odlišení jednotlivých neoplazií a je tedy použitelný pro diagnostický algoritmus neoplazií a navíc je odlišný u různých stadií (stage) dané konkrétní neoplazie. V porovnání s analýzou genové exprese je vyšetření expresního profilu microRNA validnější metodou.

### **1.4. Genomika DLBCL**

#### **1.4.1. Genový expresní profil DLBCL**

Na úrovni genového expresního profilu a úrovni imunohistochemického vyšetření DLBCL je možné odlišit tři základní odlišné molekulární subtypy tohoto lymfomu, které (nejspíše) reprezentují předpokládaný původ prvotní klonogenní neoplastické buňky, tedy histogenezu DLBCL.

Molekulárními podskupinami DLBCL jsou tzv. „GCB-like“, „ABC-like“ a „Gray-zone“ [Alizadeh et al. 2000, Rosenwald et al. 2002].

#### 1.4.2. Klonální přestavba TCR a Ig

Detekce klonální přestavby TCR a Ig je metoda, která podstatným způsobem přispívá ke stanovení kategorizace lymfoproliferativního onemocnění v přibližně 5-15% řešených případech [Van Dongen et al., 1991, Van Krieken et al., 2007]. Samotná metoda a interpretace získaných výsledků prošly zásadní standardizací dle rozsáhlé studie a získaných protokolů evropského konsorcia BIOMED-2 [Van Dongen et al., 2003]. Biologický proces klonální přestavby genů TCR a Ig je v rámci známých kategorií lymfoproliferací [WHO 2008] nadále pečlivě studován, získané poznatky jsou nedílnou součástí recentního kritického hodnocení detekovaných výsledků [Langerak et al., 2012] a příslušné studie se snaží o rozšíření standardizace fáze pre- a postanalytické, jejíž základy byly položeny projektem BIOMED-2. Proces přestavby genů Ig a TCR začíná již v ranných stádiích vývoje B, resp. T lymfoidních buněk. Přestavba (náhodná přestavba) V, D a J genů vede k vytvoření jedinečných V(D)J exonů a potažmo unikátnímu spektru antigenních Ig a TCR s odhadovaným možným vznikem řádově přibližně  $10^{12}$  molekul Ig nebo TCR a tedy i s velmi nízkou pravděpodobností získání identického receptoru Ig nebo TCR na povrchu daného lymfocyty [Langerak et al., 2012]. Detekce identické přestavby Ig nebo TCR v lymfoidní populaci tak ukazuje na její klonální evoluci. Jak B tak T-lymfoidní buňky podstupují ve svém vývoji několik diferenciačních stádií a v obojí populaci probíhá hierarchická přestavba genů pro Ig, respektive TCR [Van Zelm et al., 2005, Dik et al., 2005]. B prekurzorové buňky začínají svoji genovou přestavbu na IGH lokusu, nejdříve v oblasti D-J genů s následujícím připojením V genu, expresí a kontrolou IgH řetězce v preB-buněčném receptorovém komplexu [Langerak et al., 2012]. Poté do přestavby vstupuje IGK lokus s geny V a J, pokud je neúspěšná, dochází k přestavbě IGL lokusu taktéž v genech V a J [Langerak et al., 2012]. Hierarchická přestavba TCR lokusu, respektive TCRD lokusu začíná na genech D-D, D-J a VD-J s následující přestavbou TCRG lokusu na genech V-J a pokud není získán optimální TCR $\gamma\delta$  receptor, je iniciována přestavba TCRB lokusu na genech D-J a posléze na genech V-DJ, a přestavba TCRA lokusu s rekombinovanými geny V-J [Langerak et al., 2012]. Výsledkem náhodného procesu rekombinace V(D)J genů (doprovázen i náhodnou inzercí dalších nukleotidů) je jedinečný antigenní receptor Ig nebo TCR, který je vysoce afinní k danému antigenu a nízkoafinní k autoantigenům. Pokud je však porušen čtecí rámec tří nukleotidů (tripletové kodony) a vzniká „out-of-frame“ přestavba nebo vzniká stop kodon, dochází ke zcela neefektivní přestavbě (teoreticky až 75% přestaveb), nicméně však současně velmi často probíhají dva pokusy o přestavbu, tedy na obou alelách příslušného genu, která zvyšuje šanci na úspěšnou přestavbu genů pro Ig nebo TCR [Langerak et al., 2012]. Lze tedy předpokládat, že bialelické přestavby budou (a jsou) běžně detekovány i u maligních lymfoproliferací vzhledem k jejich histogenezi vycházející (nejspíše) z jediného transformovaného lymfocyty, a je tudíž možné se setkat s monoklonálními přestavbami v kombinaci dvou odlišných V-(D)J nebo s jednou kompletní V-(D)J a jednou nekompletní D-J



přestavbou, a nelze je navíc interpretovat jako detekci dvou odlišných lymfoidních klonů [Langerak et al., 2012]. Reálný výskyt dvou paralelních neoplastických lymfoidních klonů dosahuje přibližně 5% maligních lymfoproliferací [Sanchez et al., 2003, Sanchez et al., 2006] a ve vyšetřovaném vzorku je potvrzen přítomností dvou morfologicky, imunohistochemicky nebo flowcytometricky odlišných maligních populací. Obtížné případy mohou přinášet rozvahu a otazníky nad detekcí bíaleické monoklonality nebo biklonality a nebo multiklonality či oligoklonality, přičemž velmi dobrou pomůckou je pečlivé zhodnocení počtu odlišných PCR produktů na daný lokus [Langerak et al., 2012]. Nicméně pokud pochybnosti přetrvávají, je optimálním řešením opakování (duplikace) PCR vyšetření, které ukáže reprodukovatelnost výsledků obou kol PCR analýzy v porovnání získaných amplikonů, tedy velikosti amplikonů a intenzity jejich signálu [Langerak et al., 2012]. Zajímavostí je, že lokusy IGK a TCRB jsou výjimečné tím, že vzhledem k jejich specifické konfiguraci je možný souběh více přestaveb (více než jedna) na jedné alele s počtem PCR produktů rovných nebo více než tři, nicméně je tento výsledek stále kompatibilní s přítomností jednoho lymfoidního klonu. Dlouhodobý zlatý standard detekce klonality, Southern blot analýzu, nahradila metoda multiplex PCR analýzy dle BIOMED-2/EuroClonality konsorcia, která získala vysoký stupeň klonální detekce nejen díky optimalizaci designu primerů, ale též implementací detekce IG kappa, TCR beta, IGH D-J, TCR beta D-J. Analytická fáze detekce klonality tak v současné době dospěla ke svému vrcholu a pozornost se nyní přesouvá na preanalytickou fázi a fázi interpretace získaných výsledků. Dřívější vysoký stupeň falešné negativity byl spojen s limitovanou analýzou klonální přestavby, jen s detekcí TCR gamma, respektive jen s detekcí kompletní přestavby IGH V-J. Nynější snaha vytvoření postanalytických algoritmů hodnocení výsledků detekce klonální přestavby Ig/TCR naráží na fakt, že použitá metoda je kvalitativního typu a ne kvantitativní evaluací. Zásadními body v preanalytické fázi optimalizace detekce klonální přestavby Ig/TCR jsou kontextuální klinický nálezn, získání reprezentativního materiálu, uchování materiálu ve vhodném médiu včetně „handling“ materiálu, izolace DNA ze vzorku (pole, čistota a integrita DNA) a výběr vhodného cíle detekce klonální přestavby Ig/TCR – tedy optimalizovaný a standardizovaný preanalytický „workflow“. Neoptimálnějším materiálem pro detekci klonální přestavby jsou vzorky nativní tkáně, tkáně mražené nebo uchované v RNA lateru a následně mražené. Běžně jsou však vzorky suspektní lymfoproliferace dodávány ve FFPE tkáňových blocích, u kterých je očekávatelný vyšší stupeň degradace DNA, nicméně i z takto ošetřené tkáně lze po úspěšné kontrole čistoty (odstranění PCR inhibitorů) a integrity (kontrolní amplikon o velikosti 300bp, s adaptací koncentrace) izolované DNA očekávat validní výsledky PCR vyšetření. Cíl PCR vyšetření klonální přestavby Ig/TCR se odvíjí od předpokládané lymfoproliferace a navržený algoritmus je součástí EuroClonality guidelines. V případě suspektní B-lymfoproliferace jsou doporučeným cílem tři odlišné IGH FR a současně či následně detekce IGK. Senzitivita detekce klonálního cíle v kombinaci IGH V-J a IGK dosahuje více než 95% a zbývající případy s klonální přestavbou je možné detektovat v druhém kole za použití IGH D-J a

IGL [Langerak et al., 2012]. Optimálním cílem PCR vyšetření klonální přestavby TCR u suspektní T-lymfoproliferace jsou TCRG a TCRB, ať už paralelně či následně detekované. TCRD je společně s TCRG preferenčním cílem analýzy vymezeným jen pro suspektní TCR $\gamma$  $\delta$  a lymfoblastické T-lymfoproliferace z důvodu možné detekce pseudoklonality (TCRD přestavby jsou během přestavby TCRA odstraněny, výsledkem je dostatek TCRD templátu s preferenční amplifikací). Navíc detekce TCRD mimo uvedené kategorie může vést k detekci reálné klonální přestavby, která není spojena s maligní lymfoproliferací [Beldjord et al., 1993]. Pro detekci klonální přestavby Ig/TCR při dostatečné integritě DNA jsou vhodné cíle i s většími amplikony (do 300-400bp), jako je IGH FR1, FR2, IGK Kde, TCRB. Pokud je však fragmentace izolované DNA vyššího stupně, nicméně stále s dostatečnou integritou do 200bp, jsou optimálními cíli IGH FR3, IGK V-J a TCRG. IGH D-J a IGK Kde nevykazují tendenci k somatickým hypermutacím a jsou vhodným/vhodnějším cílem detekce klonální přestavby u late/post-GC maligních B-lymfoproliferací (extenzivní somatická hypermutace brání optimálnímu annealingu použitých primerů) v rámci komplementarity detekovaných cílů klonality. U případů s malým zastoupením suspektní maligní B či T populace je zcela zásadním krokem zvýšení koncentrace izolované DNA nebo provedení laserové mikrodisekce suspektních buněk s následnou analýzou získané DNA. Během hodnocení výsledků postanalytické fáze musí být respektováno několik aspektů, z nichž klíčové jsou „cross-lineage infidelity“ a nespecifické amplifikace [Rothberg et al., 2012, Sproul et al., 2012, Lenze et al., 2012, Langerak et al., 2012, Groenen et al., 2012]. Falešně negativní výsledky detekce klonality mohou být spojeny s již výše zmíněnou extenzivní somatickou hypermutací, rozsáhlou degradací izolované DNA (převážně FFPE tkáně) nebo také s aberantní přestavbou IGH při translokaci t(14;18) a t(11;14), které nejsou amplifikovány v IGH multiplex PCR. Velikost získaných amplikonů v multiplex PCR může být velmi variabilní (interval 5-95%), nicméně detekované definované variabilní amplikony (hlavním důvodem je proces somatické hypermutace) stále představují průkaz klonální přestavby a v případě přesahu definovaného intervalu amplikonu („over“ a „undersized“ amplikony) je možné určit klonalitu pouze při absenci nespecifických produktů PCR [Rothberg et al., 2012, Vargas et al., 2008, Liao et al., 2010]. Více detekovaných peaků či bandů jako výsledek identické V-J přestavby může být součástí „cross-annealing“ procesu, kdy rodina V-specifických primerů se váže na geny odlišné V-rodiny [Van Dongen et al., 2003]. Všeobecnou nevýhodou multiplex PCR oproti monoplex PCR je relativně vysoké riziko vzniku nespecifických amplifikací v případě malého počtu B/T populace v analyzovaném vzorku a potažmo omezená kompetice o reálný Ig/TCR templát [Van Dongen et al., 2003, Langerak et al., 2012]. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines popisují recentně známé nespecifické produkty [Van Dongen et al., 2003, Langerak et al., 2012]. Většina lymfoidních buněk prochází klonální přestavbou příslušného Ig nebo TCR lokusu na obou alelách (bialeická klonální přestavba) a proto detekce dvou bandů či peaků běžně nepředstavuje biklonalitu. Nicméně reálná biklonalita jako biologický fenomén existuje,

vyskytuje se přibližně v 5% maturovaných maligních B-lymfoproliferací a v takových případech je zapotřebí zjištěnou biklonální přestavu IGH/IGK korelovat s příslušnou morfologií, imunohistochemickým vyšetřením a imunoflowcytometrií [Sanchez et al., 2003, Sanchez et al., 2006]. Specifická konfigurace některých lokusů Ig a TCR, převážně IGK a TCRB, může vést k vícečetným klonálním přestavbám na identické alele a k detekci až čtyř různých přestaveb IGK či TCRB, které jsou stále v souladu s přítomností monoklonální B, respektive T-populace [Langerak et al., 2012]. Limitovaný počet T nebo B buněk ve vyšetřovaném vzorku může být příčinou preferenční amplifikace a falešně detekované monoklonality, tedy pseudoklonality, která může být řešena duplikací provedené PCR analýzy ke stanovení reprodukovatelnosti výsledku klonální přestavby [Sproul et al., 2012]. Během vystupňované imunitní reakce může být detekováno mnoho klonálních peaků či bandů, které však souvisejí s imunitní klonální expanzí lymfoidních buněk a nelze je tedy interpretovat jako známku probíhajícího maligního procesu [Langerak et al., 2007, Nam-Cha et al., 2008]. Detekce oligoklonální T-populace v periferní krvi nebo tkáni jedinců ve vyšší věkové kategorii, u pacientů s imunodeficitem či v imunosupresi představuje imunosenescentní vývoj T-lymfocytů (restrikce repertoáru T-buněk), respektive redukovanou nebo suprimovanou produkci T-lymfocytů [Van Dongen et al., 1991]. Identické procesy senescence či suprese lze očekávat i u B-lymfoidní populace [Langerak et al., 2012].

#### **1.4.3. Somatická hypermutace u „normální“ – fyziologické a neoplasticky transformované B-lymfoidní buňky**

„Pre-germinal center“ stádium vývoje B-lymfocytu je spojeno s expresí IgM, IgD a CD5 a expresí nemutovaných V-genů IgH. Kompartment paměťových B-lymfocytů je charakterizován přítomností somatických mutací V-genů. Během vývoje a diferenciaci B-lymfocytu geny pro Ig procházejí specifickými změnami. B-lymfoidní prekurzorové buňky využívají V(D)J rekombinační proces pro sestavení genů regionů VH a VL a pokud jsou tyto B-lymfoidní buňky úspěšné ve vytvoření funkčních, affinních a neautoreaktivních antigenních receptorů, pak jsou následně uvolněny do periferního „kompartmentu“ jako pool periferních B-lymfocytů – tzv. „náive“ B-lymfoidních buněk. V prostředí germinálního centra (GC) sekundárních lymfoidních folikulů procházejí geny pro Ig modifikačním procesem tzv. „class-switch“ rekombinace (rekombinace na třídu Ig) a následně i somatickou hypermutací (buňky „late-GC“), která zajišťuje získání vyšší afinity Ig daného klonu buněk. V případě snižující se afinity k danému antigenu je u této populace B-lymfocytů spuštěna apoptóza. Somatická mutace V-regionů genů pro IgH jsou tedy známkou „late-GC“ B-buněk a i jejich následných vývojových stupňů post-GC.

Většina periferních krevních B lymfocytů vykazuje expresi IgM (přibližně 90%) a lze ji rozlišit na dvě skupiny IgD+ (přibližně 90%) a IgD- (přibližně 10%) B lymfocytů. IgM+ IgD- B lymfoidní buňky vykazují přítomnost somatických hypermutací genů pro Ig a naopak IgM+ IgD+ B-lymfoidní buňky a non-GC B-lymfocyty, které neprošly GC, nenesou žádné nebo jen málo somatických hypermutací genů pro Ig. Právě tyto B-lymfocyty zahrnují populaci s „naive“ a nemutovaným repertoárem imunoglobulinů. Avšak mezi „class-switched“ a „IgM-only“ B-populací se nachází též podskupina IgM+IgD+ B-buněk, která exprimuje též CD27. CD27 exprimující B-buňky jsou paměťovými lymfocyty a právě IgM+IgD+ a CD27+ B-lymfocyty běžně nesou somaticky mutované geny pro Ig. Kdežto IgM+ IgD+ a CD27- B-populace obsahuje somaticky nemutované geny pro imunoglobuliny.

Existuje populace B-lymfocytů, která vykazuje fyziologickou pozitivitu CD5 a tyto buňky prezentují hlavní část B-populace v časném vývoji jedince člověka. Následně se během života jedince snižuje zastoupení CD5 pozitivní subpopulace na přibližně 10-25% všech periferních B-lymfocytů . V dospělosti většina „class-switched“ B-lymfocytů periferní krve exprimuje IgG a IgA a jsou CD5 negativní. CD5 pozitivní B buňky běžně exprimují IgM a IgD (90%) a jen v minoritě IgM (10%). První skupina a většina z druhé skupiny (IgM „only“) nese geny pro Ig bez somatických mutací. Většina CD5 pozitivních B-buněk získaných od zdravých jedinců obsahuje somaticky nemutované geny pro imunoglobuliny podobně jako tonsilární CD5 pozitivní B-populace a vykazují tvorbu stejného izotypu Ig. B-populace je kaskádou antigení stimulace atrahována do GC a somatické mutace jsou vloženy do jejich přestavěných V genů. V mikroprostředí GC lze odlišit dvě základní B-buněčné subpopulace – proliferující centroblasty a „resting“ centrocyty. Během „class switch recombination“ část B-buněk GC přeskupují geny pro izotyp IgM na IgG, IgA nebo IgE. VHDHJH segmenty u GC B-lymfocytů, které exprimují  $\mu$ -řetězce, vykazovaly signifikantně nižší stupeň somatických mutací než tytéž segmenty u B-lymfocytů exprimující  $\gamma$ -řetězce. Průměrné zastoupení mutací bylo přibližně 2% u B-lymfocytů s  $\mu$ -řetězci a 4% u B lymfocytů s  $\gamma$ -řetězci. Dva základní typy B-lymfocytů jsou tvořeny v GC a jsou to (sekreční, funkční) plazmocyty a paměťové B-lymfocyty. Antigen specifické, somaticky mutované B-lymfocyty produkované během T-buněčně dependentní imunitní reakci běžně přeskupují geny pro imunoglobulin IgM na jiný izotyp. Současné studie na „class-switched“ B lymfoidní populaci ukazují, že téměř veškeré tyto buňky nesou somaticky mutované V geny. Somaticky mutované V geny jsou také detekovány u IgM exprimujících buněk, a to u IgM „only“ a u IgM+ IgD+ CD27+ podskupiny B-lymfocytů. IgM „only“ B-buňky jsou „resting“ populací, která neexprimuje žádný z markerů populace GC - CD10, CD38 nebo CD77 a neexprimují „aktivační“ molekuly - CD25, CD71. Po aktivaci receptoru CD40 a spuštění příslušné signální dráhy tvoří „class switched“ a IgM „only“ B-buňky daleko více solubilních imunoglobulinů než aktivované „naive“ B-buněčné populace. Významným rozdílem mezi IgM „only“ a „class switched“ populací B-buněk je dvojnásobný rozdíl v průměrném objemu

somatických mutací příslušných přestavěných genů pro imunoglobuliny, které dosahovaly přibližně 2% u IgM „only“ a 3,9% u „class switched“ B-populací. Dosud neexistuje přímé potvrzení, že IgM „only“ buňky reprezentují populaci paměťových B-buněk derivovaných v GC, ale zastoupení somatických mutací genů pro Ig je u IgM „only“ a IgM pozitivních B-buněk germinálního centra obdobné (cca 2%) a také u „class-switched“ periferních B-buněk a B-buněk z GC bylo zjištěno obdobné zastoupení somatických mutací (cca 3,3- 4%). Iniciálně jsou Ig-M exprimující B-buňky atrahovány v paměťový kompartment a jsou následovány „class switched“ populací B-buněk. Tyto B-buňky projdou několika koly somatických mutací, na které navazuje selekce B-buněk dle afinity produkovaných imunoglobulinů (cílem je tedy získat co nejafinnější strukturu imunoglobulinů). IgM+ IgD+ CD27+ B-lymfocyty jsou třetí potenciální podskupinou paměťových buněk (ke kterým náleží skupina „class switched“ a IgM „only“ B-buněk) která je CD23 negativní a nese obdobný objem somatických mutací jako IgM „only“ populace (cca 2%). Paměťové B-lymfocyty „class switched“ a IgM „only“ zahrnují přibližně 10-15% periferních B-lymfocytů (B-lymfocytů periferní krve). IgM+ IgD+ CD27+ B-buňky jsou pravděpodobně generovány GC-dependentní a GC-independentní cestou. Efektorové sekreční plazmatické buňky – efektorové buňky humorální imunity – mohou být též vytvářeny GC-dependentním a GC-independentním způsobem, avšak převážná většina plazmatických buněk má původ v kompartmentu germinálního centra.

Somatické mutace V-genu u lidských maligních B-buněk (vybrané B-nonHodgkinské lymfomy – B-NHL) dosahují 0% u nemutovaných forem B-CLL (IgM+IgD+), 1-10% u mutovaných forem B-CLL (IgM+/-, IgD+, IgG+), 3,7-8,0% u lymfomu z marginální zóny - MZL (IgM+) a 2,0-25,9% u DLBCL NOS

### **1.5. Proces nazývaný „homing“ lymfoidních buněk**

“Homing“ lymfoidních buněk je proces, jehož podkladem je koordinovaná lymfocytární migrace a recirkulace v mikroprostředí, které kontroluje jejich diferenciaci, přežití a distribuje imunologický „repertoár“ včetně cílujících efektorových lymfocytů k místu antigenní stimulace. Lymfocytární homing je proces o mnoha krocích, který využívá chemotaxi a buněčnou adhezi. A právě diseminace neoplastické populace lymfomu je běžně a spíše konzervativním fyziologickým chováním než odrazem biologické progresse tohoto typu neoplazie obecně. Charakteristické vzorce diseminace lymfomu často připomínají základní proces homingu lymfocytů, což vysvětluje přísně tkáňově specifickou diseminaci, např. u slizničních lymfomů, kožních lymfomů a mnohočetného myelomu. Pochopení molekulárního mechanismu, který je součástí homingu, může přinést zásadní nové poznatky přirozeného chování lymfoidní neoplazie, ale také přispět k optimalizovanější diagnostice a označit nové potenciální cíle terapie lymfomů.

Dvěma základními pilíři lidského organismu proti mikrobiální invazi jsou specifické rozpoznání cizího antigenu a efektivní imunologický dohled. Proces evoluce je podkladem širokého spektra antigenů a tím i receptorové škály a zároveň i podkladem vlastností lymfoidních buněk – kromě jiného jsou obdařeny vysokou motilitou a migrační schopností. Již před čtyřmi desetiletími byla Gowanem a Knightem objevena recirkulace maturovaných lymfocytů, které se kontinuálně přemísťují z periferní krve do tkání a zpět do krevního oběhu. Tato recirkulace je regulována mechanismem, který umožňuje lymfocytům diapedezu na příslušném místě a směřuje jejich migraci na cílovou destinaci v tkáni. Přímo ve tkáni vykazují lymfoidní buňky charakteristickou ameboidní formu buněčné migrace, která je fyzikálně optimalizovaným typem pohybu umožňující snadný modus migrace do tkání a mezi jednotlivými typy tkání a tkáňovými kompartmenty. Lymfocytárně-endoteliální rozpoznávací proces hraje nezastupitelnou roli kontrolující přístup specializované podskupiny lymfocytů do příslušné tkáně a tkání a tak ovlivňující vývoj místní imunitní reakce a reakce zánětlivé. Na molekulární úrovni je proces homingu regulován adhezními molekulami v souhře s chemokiny. Lymfocytární buňky a endotelie specificky programují expresi svých adhezních molekul, chemokinů a receptorů pro chemokiny, což dovoluje selektivní migraci lymfocytů do specifických funkčních kompartmentů imunitního systému. Celková distribuce neoplastické lymfoidní populace závisí na rovnováze mezi vstupem do kompartmentu, proliferací a retencí /výstupem v daném kompartmentu.

### **1.5.1. Migrace lymfoidních buněk**

Buněčná migrace je univerzálním procesem a celá řada buněk má schopnost a možnost migrace během svého vývoje a diferenciaci. Tento typ migrace je esenciální pro tkáňovou morfogenezi, leukocytární cirkulaci, epiteliální obměnu a obecně regeneraci a reparaci. Deregulace buněčné migrace je proces probíhající v neoplazii během jejího vývoje a diseminace, má tedy podstatný podíl na nádorové invazi a metastazování. Existuje buněčně specifický typ migrace a dnes rozpoznáváme nejméně 3 charakteristické typy migrace buněk a to mezenchymální a améboidní typ migrace jednotlivých buněk, třetím typem je soupohyb buněk nazývaný kolektivní migrací. Jsou známy některé z molekul, které hrají klíčovou úlohu v migraci buněk včetně kontroly této migrace a v určení specifického typu buněčného pohybu. Mezi tyto molekuly náleží  $\beta 1$  a  $\beta 3$  integriny, resp. jejich rodiny, které umožňují interakci s extracelulární matrix (ECM), matrix metaloproteinázami (MMP) a serinovými proteinázami (uPA/uPAR), jež jsou zodpovědné za degradaci ECM. Taktéž další molekuly se podílí na buněčné migraci - cadheriny a asociované molekuly, které udržují stabilní intercelulární adhezi, signální molekuly, které udržují stabilitu a aktivitu aktinového cytoskeletu – malé GTPázy RhoA, Rac a Cdc42 a jejich „downstream“ efektorové molekuly. Během mezenchymální migrace, která patří k jednomu z archetypů buněčné migrace, buňky využívají sekvenci změn, které zahrnují (1) buněčnou polarizaci (umožněna lokální polymerizací aktinu s vytvořením hlavního pseudopodia), (2)

ukotvení tohoto pseudopodia k ECM ligandům via  $\beta 1$  a  $\beta 3$  integrinových nakupení (fokální adheze), místa interakce, která využívají cytoplazmatický adaptor, signální a cytoskeletální proteiny a povrchové proteázy jako např. MMP a uPA/uPAR komplexy, (3) lokální proteolýzu ECM, rozšíření prostoru pro buněčný pohyb vpřed, (4) aktivaci kontraktálních proteinů (např. myosin II) a následné zkrácení membránově ukotvených aktinových filament, (5) kontrakci buňky – retrakce zadního pólu buňky s dopředným pohybem. Tento pětistupňový migrační program je typický pro pohyb jednotlivé buňky – fibroblasty, keratinocyty, neoplastické buňky, které prošly epiteliálně mezenchymální tranzicí (EMT), a tento pohyb je migrací s nízkým stupněm rychlosti, přibližně 0,1 – 2,0  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Kolektivní buněčný pohyb využívá identicky závislou migraci na integrinech a proteázách, kde buněčné junkce jsou stabilizovány cadheriny a „gap-junctions“. Současné studie poukazují, že lymfocyty nespádají do skupiny buněk s „klasicou“ pětistupňovou buněčnou migrací. Lymfocytární populace vykazuje charakteristickou formu buněčné migrace, která byla nazvána améboidní. U tohoto typu buněčného pohybu je integrinem zajišťovaná adheze parciálně rozvolnitelná a fokální stabilní kontakty nejsou vytvořeny. Pohyb lymfocytární buňky je umožněn krátkodobými, relativně málo intenzivními interakcemi se sítí stromálních buněk v zónách T a B buněčné populace lymfocytární tkáně. Chybění fokálních kontaktů a vysoká deformovatelnost lymfocytů dovoluje buněčný pohyb s velkou rychlostí, přibližně 2-30  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Rychlá deformovatelnost lymfocytárních buněk jim dovoluje projít matrikálními bariérami díky fyzikálním mechanismům – kontaktním vedením (adaptace buněčného tvaru k příslušné matrix), „elbowing“ (extenze bočních „folds“), kontrakční prstence (zúžení a protažení buněk skrz těsné prostory). Migrace lymfocytárních buněk je umožněna tvarovou změnou, lymfocyty využívají fyzikálních mechanismů nezávislých na proteázách, které umožňují relativně snadný buněčný pohyb k různým tkáňovým kompartmentům a mezi různými tkáňovými kompartmenty. Lymfocyty vystupují z krevního oběhu díky sérií interakcí s cévními endoteliemi ve specializovaných postkapilárních venulách, které se nazývají „high endothelial venules“ (HEV) a tyto cévy se nacházejí v lymfatických uzlinách a v Peyerových plátech. Prvním krokem je málo adhezivní přimknutí k endoteliím, tzv. „tethering“, které vede k „rolovacímu“ pohybu lymfocytu po příslušných endoteliích. Lymfocytární rolování je umožněno molekulami, které náležejí do rodiny selektinů a tyto jsou lokalizovány na vrcholcích mikrokloků buněčné membrány a dovolují efektivní interakce se sialomucinovými ligandy. Lymfocytární „rolling“ je přechodný, reverzibilní a pod chemokinovou signalizací / stimulací vede k aktivaci integrinů. Heparansulfátové proteoglykany exprimované na endoteliích a extracelulární matrix přispívají k aktivaci integrinů a podílejí se na zahájení procesu diapedeze prezentováním chemokinů příslušným receptorům. Interakce G proteinu spojeného s receptorem s následnou aktivací celé řady signálních molekul (např. PI3K, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CCL21, CCL17) zesiluje afinitu a aviditu lymfocytárních integrinů, což vyúsťuje ve velmi rychlé

zachycení lymfoidních buněk (řádově ms) v krevním proudu. Specifické integriny (LFA-1 -  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7) umožňují vytvoření stabilní adheze a zahajují migraci lymfocytů skrz stěnu příslušné cévy. Tato transmigrace je dále podporována interakcí s junkčními adhezními molekulami (JAMs), PECAM-1 (CD31) a CD99. Tkáňové lymfocyty jsou schopny rozpoznat gradient chemoatraktantu a zacílit svoji migraci k příslušnému cílovému místu. Výstup tkáňového lymfocytu do cirkulace je vícestupňový proces interakce lymfocytu a endotelií (rolling, activation, adhesion, diapedesis) a je předurčen unikátní kombinací adhezních molekul a chemokinových receptorů na buněčném povrchu, podobně jako klíč patřící ke svému zámku. Tato domovská známka „homing signature“ umožňuje příslušné buňce rozpoznat své místo výstupu do krevního řečiště právě na specializované endoteliální „adrese“, která vykazuje expresi relevantních ligandů a tak umožňuje tkáňově specifický „homing“. Lymfocytární homingová signatura je závislá na stádiu diferenciaci a antigení stimulaci / zkušenosti lymfocytu. Maturované „náive“ lymfocyty vykazují jednoznačné známky tropizmu k různým sekundárním lymfoidním orgánům a nevyskytují se obecně v nelymfoidních topografiích. T a B buněčné lymfoidní prekurzory během pozdních stádií své ontogeneze v thymickém kompartmentu a kompartmentu kostní dřeně up-regulují L-selectin a také chemokinový receptor CCR7. Ligandy těchto receptorů – „peripheral lymph node addressin“ (PNAd) a chemokin CCL21 – jsou exprimovány na lumenálním povrchu HEV. Naivní lymfocyty také exprimují integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 - důležitý mediátor lymfocytárního rolingu a adheze v topografii „gut-associated lymphoid tissues“ (GALTs). Kombinovaná exprese L-selectinu,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, LFA-1 a CCR7 dovoluje naivním lymfocytům přístup jak do periferní lymfoidní tkáně, tak i do GALTs, což zajišťuje účinný dohled těchto „křížovatek“ imunitního systému. Při absenci antigení stimulace vycestovávají naivní lymfocyty ze sekundárních lymfoidních tkání cestou eferentních lymfatických cév a navracejí se k recirkulujícímu lymfocytárnímu „poolu“. Naopak antigení stimulace blokuje tento výstup a následuje klonální expanze antigenně specifických lymfocytů a jejich diferenciaci ve funkčně specializovanou efektorovou lymfoidní populaci nebo populaci paměťových buněk. Jako integrální část tohoto diferenciačního procesu lymfocytů je „homing signature“ revidována na unikátní kombinaci adhezních molekul a chemokinových receptorů dovolující preferenční výstup z krevního proudu do místa lymfoidní tkáně, kde dochází k iniciální aktivaci příslušného lymfocytu. Navíc nově získaný „homing“ profil umožňuje danému lymfocytu opustit krevní proud do nelymfoidní tkáně, která je drénována příslušnou regionální lymfatickou uzlinou. Kompletní molekulární mechanismus kontrolující reprogramování „homing signature“ lymfocytů není v současné době zcela znám a plně vysvětlen. Recentní studie ukazují, že interakce s dendritickými buňkami (DCs) hraje nezastupitelnou roli, např. priming lymfocytů slizničními DCs (střevní sliznice) zvyšuje expresi  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 a CCR9, molekul, které zahajují specifický homing do topografie střeva. Naopak aktivace lymfocytů kožními DCs snižuje  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 a CCR9



a zvyšuje expresi kožního homing receptoru – „Cutaneous lymphocyte antigen“ (CLA). Nejznámější a nejlépe popsané dráhy homingu lymfocytů jsou ty, které umožňují homing v „gut-associated lymphoid tissue“ (GALT) a „skin associated lymphoid tissue“ (SALT). Jak kůže, tak i střevní sliznice představují bariérové tkáně, které jsou exponovány velkému množství antigenů. Je tedy představitelné, že tyto specializované homingové cesty se vytvořily pro oddělení intestinální a kožní imunity, které ochraňují robustní sekundární imunitní odpovědi před tkáňově vázanými (tkáňový tropizmus) patogeny. Efektorové/paměťové T-lymfocyty se specifickým homingem ke střevu a kůži mohou být lehce identifikovány v krvi zdravých dárců díky jejich exkluzivně odlišné expresi  $\alpha 4\beta 7$  a CLA. Tyto molekuly umožňují „rolling“ díky interakci s jejich endoteliálními „counterreceptory“, respektive MAdCAM-1 a E-selektinem. Po chemokiny zesílené aktivaci způsobuje integrin  $\alpha 4\beta 7$  „arrest“ (uvěznění) intestinálního lymfocytu na endotelu. Navíc kromě zprostředkování T-buněčného homingu do střeva hraje  $\alpha 4\beta 7$  zásadní roli i v migraci B-lymfocytů a plazmablastů do Peyerových plátů a do střevní lamina propria. Na rozdíl od střevních a kožních homingových efektorových paměťových buněk udržuje populace tzv. centrálních paměťových buněk svoji expresi L-selektinu a CCR7 a zůstává v recirkulaci skrze periferní lymfatické uzliny. Kromě tkáňově specifické exprese adhezních molekul hraje klíčovou roli v homingu kožních a intestinálních T-lymfocytů i topograficky specifická produkce chemokinů. CLA pozitivní T-buňky selektivně exprimují CCR4 a CCR10, jejichž ligandy CCL17 a CCL27 jsou prezentovány na lumenálnímu povrchu postkapilárních venul kůže. Blokování těchto chemokinů nebo jejich receptorů znemožňuje migraci CD4+ lymfocytů do kůže. CCR9 a jeho ligand CCL25 nesou analogickou úlohu u migrace T-buněk do střeva. CCR9 je exprimován podskupinou T-buněk s výraznou expresí  $\alpha 4\beta 7$  tak jako u T-lymfocytů výstelky a lamina propria tenkého střeva, zatímco CCL25 je produkován výstelkou krypt tenkého střeva a je prezentován na lumenálním povrchu endoteliálních buněk intestinálních postkapilárních venul. Blokování CCL25 inhibuje akumulaci antigen specifických efektorových T-lymfocytů ve sliznici tenkého střeva. Migrace B-lymfocytů do lymfatických uzlin vyžaduje kombinovanou expresi CCR7 a CXCR4 na povrchu B-lymfocytů. Vstup do Peyerových plátů navíc vyžaduje expresi CXCR5. Ligandy CCL21 a CXCL12 jsou široce exprimovány na HEV, zatímco ligand CXCL13 je přítomen pouze selektivně na HEV Peyerových plátů. Interakce ligandu CCL25 a receptoru CCR9 přispívá také k migraci IgA plazmablastů do tenkého střeva. Migrace plazmablastů je dále ovlivněna epiteliálním chemokinem CCL28, který se váže na receptor CCR10 plazmablastů. CCL28 je také exprimován na epiteliích sliznic v jiných topografiích, které náležejí obecně k slizničnímu imunitnímu systému. Jakmile lymfocytární populace respektive jednotlivé lymfocyty opustí krevní proud, jsou atrahovány ke své specifické tkáni a jejímu mikroprostředí gradientem rozhodujícího chemokinu. Ligand CXCL13 je specificky exprimován folikulárně dendritickými buňkami (FDC's) a ztráta jeho funkce vede k porušení vývoje primárních lymfatických

folikulů a germinálních center sekundárních folikulů. Uvnitř germinálního centra právě  $\alpha 4\beta 1$  v souhrě s LFA-1 umožňuje interakci B-buněk s FDC's. Tyto interakce kontrolované B-buněčným receptorem a mediované integrinem inhibují apoptózu B-buněk germinálního centra a mohou být jedním ze zásadních kroků v tzv. afinitní maturaci lymfoidních buněk.

### 1.5.2. Molekulární podstata diseminace lymfomů

Celá řada klinických pozorování vede k závěru, že zachovalý homing program neoplastické lymfoidní buňky umožňuje empiricky známou diseminaci non-Hodgkinových lymfomů (NHL), např. B-chronické lymfocytární leukémie/malobuněčného lymfocytárního lymfomu a mantle-cell lymfomu, které obvykle vykazují systémovou diseminaci v době diagnózy. Zatímco NHL, které vycházejí z lymfocytů u nichž probíhá aktivní proliferace a diferenciace, např. DLBCL a Burkittův lymfom (BL), jsou iniciálně často a typicky pouze lokálním procesem. Neoplastická diseminace do míst traumatu nebo zánětu je běžně pozorována u pacientů s diagnózou neoplastického lymfoproliferativního onemocnění a podporuje hypotézu specifického ovlivnění migrace neoplastických buněk lokálně produkovánými chemokiny a aktivovanými endoteliemi. Extranodální lymfomy vznikající v GALT (gut-associated lymphoid tissue) nebo v kůži (SALT) vykazují silnou tendenci k diseminaci do oblasti sliznice GIT resp. do kůže, eventuálně mohou infiltrovat regionální lymfatické uzliny, které se podílejí na fyziologické recirkulaci jejich nenádorových protějšků.

A jaký podklad využívá diseminace T lymfomů? Virtuálně všechny maturované T-buněčné lymfomy jsou derivovány z paměťových T-buněk (CD45RO+) a jsou označeny jako periferní T-buněčné lymfomy oproti centrálním / thymocytárně derivovaným prekurzorovým T-lymfomům. Periferní T lymfomy představují heterogenní skupinu neoplazií zahrnující několik dobře definovaných jednotek s vyhraněnými molekulárními, patomorfologickými znaky a klinickou prezentací. Charakteristika těchto neoplazií v místě vzniku (primární místo) a v místech jejich diseminace (sekundární metachronní místa) byla již poznána, resp. byla rozpoznávacím znakem a důležitým kritériem pro klasifikaci lymfomů na odlišné / vyhraněné klinicko-patologické jednotky. Tato historicky daná empirická praxe může být dnes podložena i molekulární podstatou procesu. Kožní T lymfomy (CTCL) představují dobrý příklad typu lymfomu vykazujícího tkáňově specifickou diseminaci. CTCL běžně exprimují jak kožní lymfocytární homing receptor CLA, tak i chemokinový receptor CCR4 často v kombinaci s CCR10 a/nebo CXCR3. Expresse těchto receptorů na neoplastických lymfocytech přítomných nejen v kůži, ale také na cirkulujících v periferní krvi umožňuje těmto buňkám efektivní homing do topografie kůže. Neoplastická populace mycosis fungoides (MF) a Sezaryho syndromu (SS), příbuzné CTCL subtypy, vykazují velmi odlišnou homingovou signaturu, která koresponduje s odlišnými typy diseminace typické pro tyto dva lymfomy. Mycosis fungoides vykazuje

charakteristicky minimální nebo žádnou infiltraci lymfatických uzlin během vzniku a vývoje této neoplazie a neoplastická populace vykazuje nízkou hladinu exprese PLN homingových receptorů L-selectinu a CCR7. Během progresu MF je infiltrace lymfatických uzlin spojena se ztrátou kožně specifických receptorů a se zvýšenou produkcí CCR7. Pro SS je obvyklé rozsáhlé systémové postižení. Neoplastické lymfoidní buňky SS koexprimují signatury pro kožní homing a homing do periferních lymfatických uzlin - L-selectin + CCR7 a CLA + CCR4. Z hlediska neoplastické disseminace představují intestinální T-buněčné lymfomy (ITLs) zrcadlový obraz svých kožních protějšků (CTCLs). ITLs, které jsou velmi často spojeny s enteropatií, exprimují slizniční receptor pro homing  $\alpha 4\beta 7$ , který jim umožňuje interagovat s MAdCAM-1 na endoteliích slizničních postkapilárních venul, ale postrádají CLA a L-selectin. Obecně exprimují integrin  $\alpha E\beta 7$ , který umožňuje interakci s E-cadherinem epiteliálních buněk střevní sliznice. Současná data předpokládají, že s enteropatií asociované T-lymfomy neexprimují chemokinový receptor CCR7, který hraje úlohu v infiltraci PLN. Nodální forma T-lymfomů prezentuje heterogenní skupinu nádorů, které mohou být subklasifikovány na odlišné „vyhraněné“ jednotky na úrovni molekulárně biologické, patologické a klinické. Část těchto nodálních T-lymfomů pravděpodobně vychází z „poolu“ centrálních paměťových T-buněk, což je spojeno s dominující expresí L-selectinu a současným neexprimováním receptoru pro kožní homing – CLA a receptoru pro slizniční homing -  $\alpha 4\beta 7$ . Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) je L-selectin negativní a tato negativita je pravděpodobně spojena s „aktivovaným“ fenotypem neoplastické populace.

Expresní profil chemokinových receptorů nodálních T-lymfomů není zcela znám a popsán, nicméně v současné době dostupné informace předpokládají odlišnou expresi u jednotlivých podtypů T-lymfomů. CCR4 je receptor pro kožní homing a je detekován pouze na minoritě nodálních T-lymfomů a přibližně polovina těchto neoplazií exprimuje Th1 chemokinový receptor CXCR3 a/nebo CCR5. Expresí těchto receptorů byla u periferních T-buněčných lymfomů NOS (PTCLU) spojena s lepší prognózou.

Diseminace B-buněčných lymfomů je založena na odlišných základech cest pohybu neoplastické B-lymfoidní buňky a to vzhledem k odlišné roli B-lymfocytů v imunitní odpovědi/reakci oproti T-lymfocytům. Úspěšný antivirový imunitní dohled (proti virem infikované populaci buněk) vyžaduje efektorové T-buňky, které disponují možností přímého fyzického přístupu k nelymfoidním tkáním a cílovým infikovaným buňkám. Efektorové B-lymfocyty jsou maturované plazmocyty, jejichž úkolem je produkce specifických protilátek v daném regionu / topografii a tyto protilátky (Ab's) jsou „solubilizovány“ v tělních tekutinách a mohou tak působit na různou vzdálenost. Nutností úspěšné funkce protilátek je migrace B-buněk, potažmo plazmocytů, do periferní oblasti místa s chronickým zánětem s místně perzistentní antigenní stimulací (*Borrelia Burgdorferi* v oblasti kůže, *Helicobacter*

pylori v oblasti žaludku, Sjögrenův syndrom v oblasti slinné žlázy). Tato perzistující antigenní stimulace běžně vede k „neoformaci“ organizované lymfoidní tkáně s místní expresí vasculárních adresinů a chemokinů, které jsou zcela běžnou, „fyziologickou“ součástí somatické lymfoidní tkáně. V místech dlouhodobé / chronické antigenní stimulace, ať už se jedná o již zmiňovanou topografii kůže, žaludku, slinné žlázy či i např. orbity, může dojít k procesu lymfomogeneze a nejčastějšími typy B-lymfomů v těchto lokalitách jsou lymfom z marginální zóny MALT-typu a folikulární lymfom. Naivní B-lymfocyty potřebují recirkulovat zcela volně v periferní a slizniční lymfoidní tkáni tak, aby měly co největší příležitost setkat se s antigeny, kdežto paměťové B-buňky a plazmocyty vyžadují migraci do své domovské a specifické sublokalizace periferní a slizniční lymfoidní tkáně vzhledem k jejich efektorové funkci. B-lymfocyty taktéž upravují svojí homing signaturu k danému specifickému stádiu vývoje. Tento maturačně závislý homingový profil je převážně dobře zachován u B-lymfomů a předurčuje diseminaci konkrétního B-lymfomu, např. naivní B-lymfocyty koexprimují PLN-homingový receptor L-selectin a intestinální-homingový receptor  $\alpha 4\beta 7$ , a právě tato kombinovaná exprese byla zjištěna u části mantle-cell lymfomů – lymfomů z plášťové zóny (MCL), které běžně postrádají somatické hypermutace ve svých genech pro variabilní část imunoglobulinu, což poukazuje na jejich původ derivovaný z naivních B-lymfocytů. Exprese  $\alpha 4\beta 7$  u MCL je spojena se zvláštním typem klinického obrazu infiltrace, který je nazýván maligní lymfomatózní polypózou (MLP). Pro MLP je charakteristické multifokální postižení gastrointestinálního traktu (GIT) a rozsáhlá infiltrace lymfatických uzlin. K adhezivnímu profilu MCL se přidává též profil chemokinových receptorů zahrnující expresi CCR7 a CXCR4, které opět přispívají k diseminaci MCL do oblasti sliznic GIT a lymfatických uzlin. Intestinální homingový receptor  $\alpha 4\beta 7$  má zásadní úlohu v homingu paměťových B-lymfocytů a plazmocytů produkujících IgA do oblasti marginální zóny Peyerových plátů, respektive střevní lamina propria. Maligní protějšky - extranodální B-lymfom z marginální zóny MALT typu exprimuje  $\alpha 4\beta 7$  a koexpresi L-selectinu „udržuje“ tento lymfom lokalizovaný a diseminující pouze v topografii sliznice. Taktéž primární GIT folikulární lymfom exprimuje  $\alpha 4\beta 7$  a je často IgA pozitivní oproti jeho nodálnímu typu, nicméně DLBCL a Burkittův lymfom v primární GIT lokalizaci neexprimují  $\alpha 4\beta 7$  a jejich primární GIT lokalizace je nejspíše spojena s expresí jiného homingového profilu, který taktéž udržuje GIT lokalizaci. K hlavním chemoatraktantům B-lymfocytů náleží ligandy CXCL12 a CXCL13, které jsou prezentovány na povrchu endotelií HEV lymfatických uzlin a Peyerových plátů, a jsou přítomny i na výstelce cév podobných HEV (HEV-like vessels) na místech lymfoidní neogeneze, např. chronický zánět / reaktivní lymfoproliferace u infekce *Borrelia burgdorferi* a Sjögrenova syndromu. Ligand CXCL12 navádí CXCR4-pozitivní B-lymfocyty do „tmavé“ oblasti (dark zones) GC sekundárních folikulů, kdežto ligand CXCL13, který je tvořen folikulárně dendritickými buňkami (FDC's) lymfoidních folikulů, atrahuje CXCR5 pozitivní B-lymfocyty do „světlé“ oblasti (light zones) GC sekundárních lymfoidních

folikulů. Chemokinové receptory CXCR5 a CXCR4 jsou exprimovány u většiny B-lymfoidních neoplazií zahrnující B-CLL, HCL, MCL, MALT lymfomy, FL a DLBCL a tyto receptory ovlivňují migraci/diseminaci těchto lymfomů. Ektopická exprese chemokinů v místě chronického zánětu s konsekvencí lokální lymfoidní neogeneze je pravděpodobně klíčovým faktorem selektivního neoplastického homingu lymfomů do těchto lokalit. Autokrinní exprese ligandu CXCL13 byla již popsána u FL a primárních lymfomů CNS. Diferenciace B-lymfocytů v plazmocyty je spojena též s koordinovanou změnou profilu exprese chemokinových receptorů, CXCR5 a CCR7 jsou down-regulovány, což vede ke ztrátě odpovědi na chemokiny B a T-buněčné zóny – ligandy CXCL13, CCL19, CCL21. Oproti tomu je receptor CXCR4, s ligandem CXCL12, up-regulován a jejich společná interakce je zapotřebí pro homing plazmocytů do oblasti kostních sklípků kostní dřene - komplexně pro homing a retenci. Kostní sklípky jsou zásadním místem (plazmatické) produkce protilátek v dospělém věku a plazmocyturní maturace a přežívání je kontrolováno stromální produkcí interleukinu IL-6. Ligand CXCL12 umožňuje transendoteliální migraci plazmocytů a indukuje adhezi k VCAM-1 a fibronektinu, která je zprostředkována přes  $\alpha 4\beta 1$ . VCAM-1 a fibronektin jsou exprimovány stromálními buňkami kostních sklípků. Jak fyziologické, tak i neoplastické plazmocytoïdní buňky (buňky mnohočetného myelomu – MM) exprimují i další chemokinové receptory, např. CXCR6, CCR3, CCR6, CCR10 a mohou tak reagovat na celou řadu ligandů/chemoatraktantů. Receptor CCR5 je přítomen na povrchu neoplastických plazmocytoïdních buněk a jeho příslušný ligand CCL3 je taktéž tvořen nádorovými plazmocytoïdními buňkami, jedná se tedy smyčkovou (autokrinní/parakrinní) pozitivní zpětnou vazbu myelomových buněk. Vysoké hladiny tohoto ligandu jsou zcela běžně detekovány v kostní dřeni infiltrované myelomovou populací. Homing populace MM v prostředí kostních sklípků je modulován mnoha faktory a jejich ovlivnění může být použito k blokování tohoto homingu, popř. zastavení proliferace myelomových buněk v kostní dřeni. Protilátky blokující adhezi nádorových plazmocytů, která je zprostředkována přes interakci s  $\alpha 4\beta 1$ , zastavují jak chemoatraktanty indukovanou migraci a adhezi, tak i inhibují proliferaci myelomových buněk. Právě adheze lidských myelomových buněk ke stromálním buňkám kostní dřene významně stimuluje sekreci IL-6, který má značný proliferační a antiapoptotický efekt na MM. Taktéž blokování integriny zprostředkované interakce mezi stromálními buňkami kostní dřene a myelomovou populací mění „niche“ potřebné pro expanzi MM. Onkogen c-Maf kromě jiného podporuje expresi proteinu cyclin D2 a expresi integrinů  $\beta 7$  zvyšující adhezi myelomové populace ke stromálním buňkám a zvyšující produkci VEGF, který má vliv na proliferaci, přežívání MM a zároveň stimuluje i neoangiogenezi v infiltrovaných kostních sklípcích. Ačkoliv obojí plazmocytoïdní populace, dlouhodobě přežívající plazmocyty a neoplastická populace mnohočetného myelomu, jsou před aktivací apoptózy chráněny integriny mediovánými interakcemi se stromatem kostních sklípků, schopnost proliferace v daném mikroprostředí je unikátní vlastností neoplastické populace MM. Cytokiny IL-6, HGF and WNTs, které jsou produkovány stromálními

buňkami kostních sklípků, poskytují populaci MM signální profil potřebný pro přežívání, proliferaci a expanzi. Adheze umožněná integriny  $\alpha 4\beta 1$  a  $\alpha 5\beta 1$  k fibronektinu může a pravděpodobně poskytuje ochranu buňkám MM před terapií indukovanou apoptózou – fenomén známý jako buněčnou adhezí mediovaná rezistence k terapii („cell adhesion mediated drug resistance“ - CAM-DR). Kostní dřev je prostředí s bohatou produkcí variabilních chemokinů a růstových faktorů, které stimulují integriny zprostředkovanou adhezí a přispívají k rezistenci populace MM k léčbě. Expresí integrinů a jejich chemokinová regulace nese komplexní úlohu v homingu, expanzi a léčebné rezistenci MM. Novou perspektivní terapií je užití natalizumabu, protilátky namířené proti integrinu  $\alpha 4$  a MLN02 proti integrinu  $\alpha 4\beta 7$ . Obecně lze antiintegrinovou terapii považovat za jednu z možných budoucích modalit v cílenější terapii neoplastických lymfoidních malignit, nicméně je nutno zmínit i možný a předpokládaný vliv na fyziologický homing a přežívání populace nenádorových lymfocytů.

## 2. Cíl projektu

Zhodnotit, popř. stanovit diagnostický imunoprofil dle WHO vyšetřovaných lymfoproliferativních onemocnění [WHO 2008], konkrétně *de novo* DLBCL NOS. Stanovit imunohistochemickou expresi výše uvedených proteinů CD10, Bcl-6, Bcl-2, MUM1/IRF4, CD30, proteinů rodiny NF $\kappa$ B (p50, p52, p65) a proliferační aktivity při stanovení Ki67 u jednotlivých kategorií vyšetřovaných B-lymfoproliferativních onemocnění (DLBCL) v retrospektivně a prospektivně získaném souboru. Statisticky zhodnotit vztah mezi imunohistochemickou expresí vyšetřovaných proteinů a délkou bezpříznakového období/období bez progresu, a obdobím celkového přežití. Statisticky zhodnotit vztah mezi imunohistochemickou expresí vyšetřovaných proteinů a sledovanými morfologickými/laboratorními parametry (základní morfologie, PKO, LDH,  $\beta 2$ mikroglobulin, sTK, IL-2, rIL-2, CA125, infiltrace KD, cytogenetické změny), radiologickými (zobrazovacími) parametry (počet pozitivních LU, velikost LU), klinickými parametry (základní klinické údaje, staging onemocnění, klinický průběh s odpovědí na terapii dle Cheson et al., B-symptomy, indexy IPI, aa-IPI, PS). Využití výsledků projektu ve zjištění biologické aktivity/agresivity neoplastické lymfoproliferace, v rutinní diagnostické praxi s předpokládaným významem pro možnou prognostickou stratifikaci, popř. cílenější terapii, tzv. "tailored therapy".

### 2.1. Pracovní hypotéza

V biologii diferenciací lymfatické buňky a nádorové lymfoidní buňky se mění exprese celé řady proteinů (např. CD1a, TdT, CD79a, CD20, CD23, CD5, CD10, Bcl-6, Bcl-2, MUM1/IRF4, CD30, PAX5), které mohou hrát roli v biologickém chování příslušné lymfoproliferace. Některé z exprimovaných

proteinů mají klíčovou úlohu pro přežívání lymfoidní buňky a zde figuruje aktivace proteinů rodiny NFκB signální dráhy. NFκB rodina proteinů s funkcí transkripčních faktorů reguluje celé spektrum "down-stream" proteinů účastných na modulaci apoptózy, buněčného cyklu a mikroprostřední, z nichž je část známa a část studována [9-17]. Obdobnou roli NFκB jako u fyziologického protějšku [10,11] lze předpokládat i u neoplastických lymfoidních buněk [8]. Hypoteticky mohou být sledované proteiny (CD10, Bcl-6, Bcl-2, MUM1/IRF4, CD30), vázaná subtypizace DLBCL NOS [Hans et al. 2004] a exprese proteinů NFκB dobrým prognostickým a prediktivním indikátorem.

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Materiál a metody**

Byly využity retrospektivně a prospektivně získané tkáňové bločky fixované ve formalínu a zalité do parafínu (FFPE) a byly též zpracovány do bločků pro tkáňovou mikroarray (TMA, ISE S.r.l. Galileo TMA CK 3500). Získané tkáňové řezy optimálně hloubky do 5μm byly standardně zpracovány a zamontovány po aplikaci níže uvedených imunohistochemických metod na skla pokrytá silanem (3-aminopropyl-triethoxysilan, Sigma, USA) nebo na skla s pozitivním nábojem. U sledovaného souboru pacientů byly zaznamenány relevantní klinické údaje, příslušné laboratorní hodnoty a molekulárně biologické parametry (tab. 2-5). Veškeré statistické analýzy byly provedeny s využitím softwaru STATISTICA 10 (Statsoft, Inc.). Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky signifikantní. Pro statistickou multivariantní analýzu detekovaných imunohistochemických znaků byla využita Cox regresní analýza [Cox 1972], Mann-Whitney a Kruska-Wallis test. Interval PFS a OS byl stanoven dle Kaplan-Meierovy analýzy.

Tab. 2 Popisné hodnoty souboru

	N	Mean	Median	Min	Max	25% quantile	75% quantile	SD
Věk	59	59,7966	64,0000	26,00000	84,0000	47,0000	73,0000	16,4953
Počet pozitivních LU	59	2,8814	2,0000	0,00000	16,0000	1,0000	3,0000	3,2221
Max. rozměr LU v cm	51	8,8745	7,0000	1,80000	25,4000	4,0000	13,0000	6,1289
Hladina Hb	59	123,5254	124,0000	77,00000	160,0000	114,0000	133,0000	17,2720
Počet leukocytů	59	8,3412	7,9600	2,90000	20,2700	6,1000	9,4300	3,4880
Počet trombocytů	59	277,3559	254,0000	64,00000	588,0000	179,0000	372,0000	121,8035
Počet lymfocytů	59	1,7693	1,3900	0,33000	8,5000	0,8700	2,2000	1,4915
Hladina β2mikroglobulinu	51	3,9408	3,0600	1,29000	15,2600	2,0700	5,3800	2,6982
Hladina s-TK	58	28,4466	13,9000	2,00000	100,0000	7,3000	31,3000	31,5298
Hladina CA 125	49	66,5388	33,0000	3,50000	595,5000	13,8000	67,5200	102,3649
Hladina IL-2	28	1,3071	1,0000	1,00000	6,4000	1,0000	1,0000	1,1668
Hladina rIL-2	41	144,2756	87,3000	13,00000	400,0000	47,5000	207,9000	129,9037
IPI	59	2,1356	2,0000	0,00000	5,0000	1,0000	3,0000	1,5252
aa-IPI	38	1,1053	1,0000	0,00000	3,0000	0,0000	2,0000	1,0343



Tab. 3 Popisné hodnoty souboru

		N	%
B symptomy	ano	25	42,37%
	ne	34	57,63%
Infiltrace KD	ano	5	8,62%
	ne	53	91,38%
LDH	zvýšená	28	47,46%
	normalní	31	52,54%
Cytogenetické změny	simplexní	22	81,48%
	komplexní	5	18,52%
CHT	PACEBO	9	15,25
	CHOP	30	50,85
	Jiná	19	32,2
PS	0	12	20,34%
	1	38	64,41%
	2	5	8,47%
	3	4	6,78%

Zkratky: BM – bone marrow, LDH – lactate dehydrogenase, CHT – chemotherapy, PS – performance status

Tab. 4 Ann Arbor staging

I	9	15,25%
II	16	27,12%
III	10	16,95%
IV	24	40,68%

Tab. 5 Pohlaví

Pohlaví	F	32	54,24%
	M	27	45,76%

### 3.2. Metoda nepřímé imunohistochemie

Po obnovení antigenicity natrávením nebo mikrovlnným ošetřením byla metodou nepřímé imunohistochemie s použitím komerčně dostupných primárních protilátek pro zjišťovaný znak / protein, resp. proti jeho antigenní determinantě ve stanoveném ředění, a sekundární protilátky pro vizualizaci standardní technikou avidin-biotin (ABC) sledována pozitivita (Fig. 4-11) v procentech a topografii u příslušného sledovaného proteinu (jádro, cytoplazma, membrána). Parafínové bločky byly nařezány na cca 4-6 $\mu$ m vzorky (optimálně 5 $\mu$ m), inkubovány v termostatu přes noc při 60°C, následně deparafinovány v xylénu, rehydratovány sestupnou řadou alkoholu. Tepelně indukovaný „retrieval“ cílového epitopu antigenu daného vzorku na sklíčku byl proveden v EDTA pufru při pH 8,9 v mikrovlnné troubě při 1000W po dobu 20 min (4x5 min), následně byly vzorky zchlazeny při pokojové teplotě (přibližně 20 min), opláchnuty destilovanou vodou a umístěny do solného roztoku Tris pufru po dobu přibližně 5 min. Endogenní peroxidázová reakce byla zablokována standardně dodávaným roztokem „peroxidase block solution“ v kitu EnVision kit a to po dobu přibližně 5 min. Následně byla sklíčka se vzorky opět opláchnuta v solném roztoku Tris pufru. Každý ze vzorků byl inkubován s primární protilátkou po dobu přibližně 30 min při pokojové teplotě. Seznam použitých protilátek včetně daného klonu a použitého ředění je uveden v tabulce č. 6. Pro vizualizaci imunohistochemického vyšetření byl použit EnVision kit s uvedeným metodickým postupem dle výrobce (DAKO, Glostrup, Denmark). Pro semikvantitativní určení positivity imunohistochemického vyšetření bylo hodnoceno procento pozitivních neoplastických buněk se svojí jaderně, cytoplazmaticky nebo membránově vyjádřenou expresí sledovaného znaku. Bločky tkáňové microarray (TMA) byly imunohistochemicky vyšetřeny a hodnoceny identickým, výše popsaným postupem.

Tab. 6

Protilátka anti-	klon	antigen retrieval	ředění	firma
CD20	L26	MW	1:100	Dako
CD10	56C6	MW, odblokování metanolem	1:40	Novocastra
CD30	Ber-H2	Vodní lázeň EDTA, pH 9,0	1:100	Dako
Bcl-2	100 (124)	MW	1:10 (1:100)	Biogenex (Dako)
Bcl-6	PG-B6p	Vodní lázeň pH 9,9 40min, CSA kit 20min, vodní lázeň pH 9,9	1:20	Dako
MUM1/IRF4	MUM1p	MW	1:50	YbuxCytomation (Dako)
Ki67	MIB-1	MW	1:200	Dako
p50	polyklonální	MW	1:400	Cell Signaling
p52	18D10	MW	1:50	Cell Signaling
p65	F-6	MW	1:400	Santa Cruz

Fig.1 – Centroblastická varianta DLBCL NOS, Giemsa, zvětšení 400x

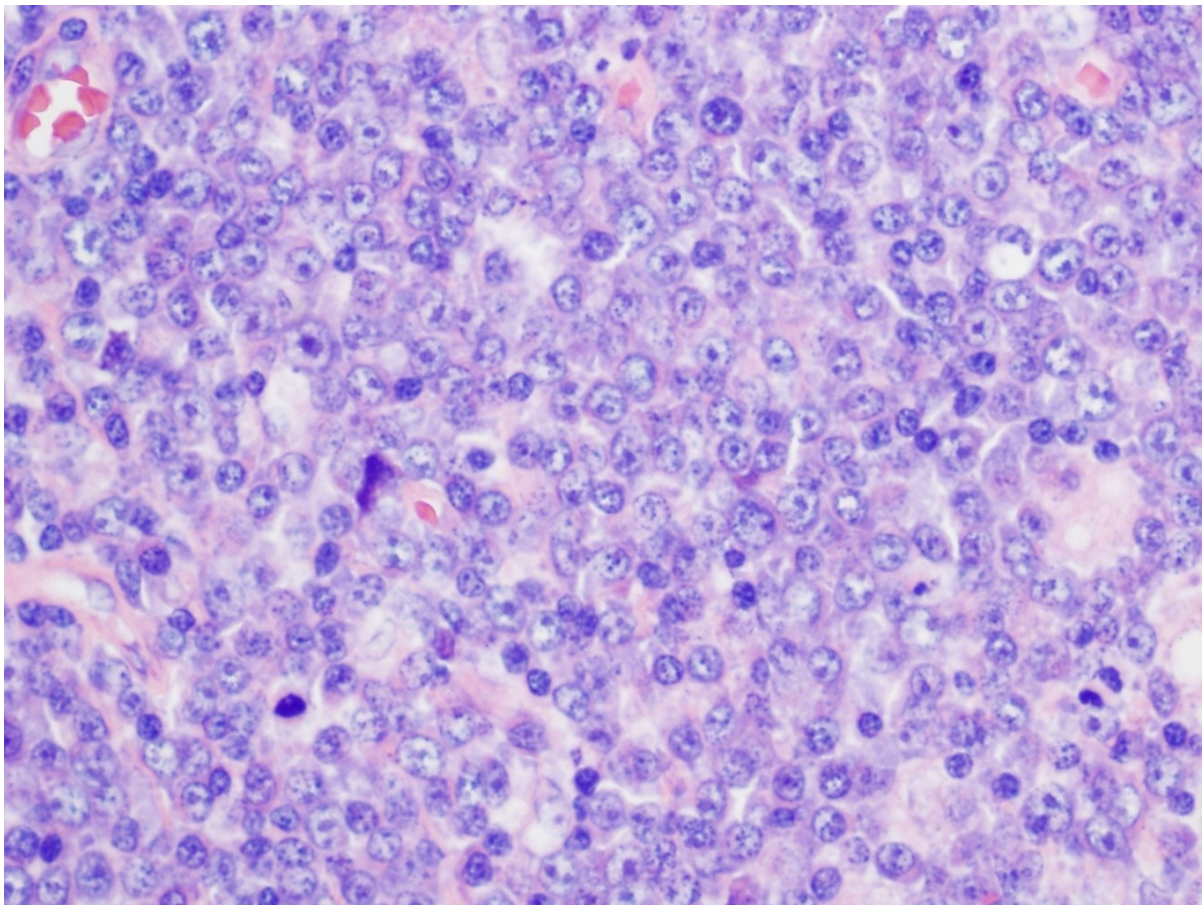


Fig. 2 – Imunoblastická varianta DLBCL NOS se „starry-sky pattern“, HE, zvětšení 200x

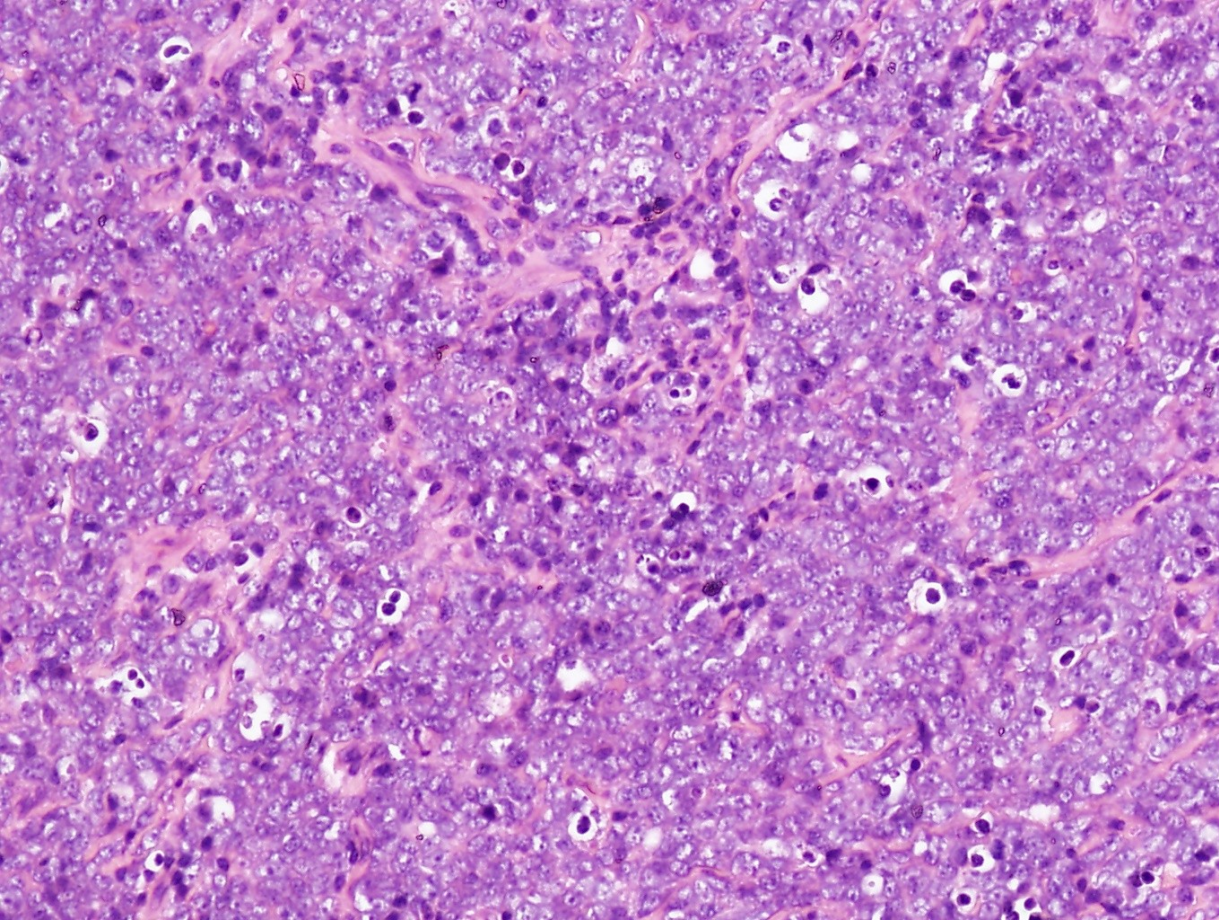


Fig. 3 – Sarkomatoidní varianta DLBCL NOS s HRS-like diferenciací, HE, zvětšení 400x

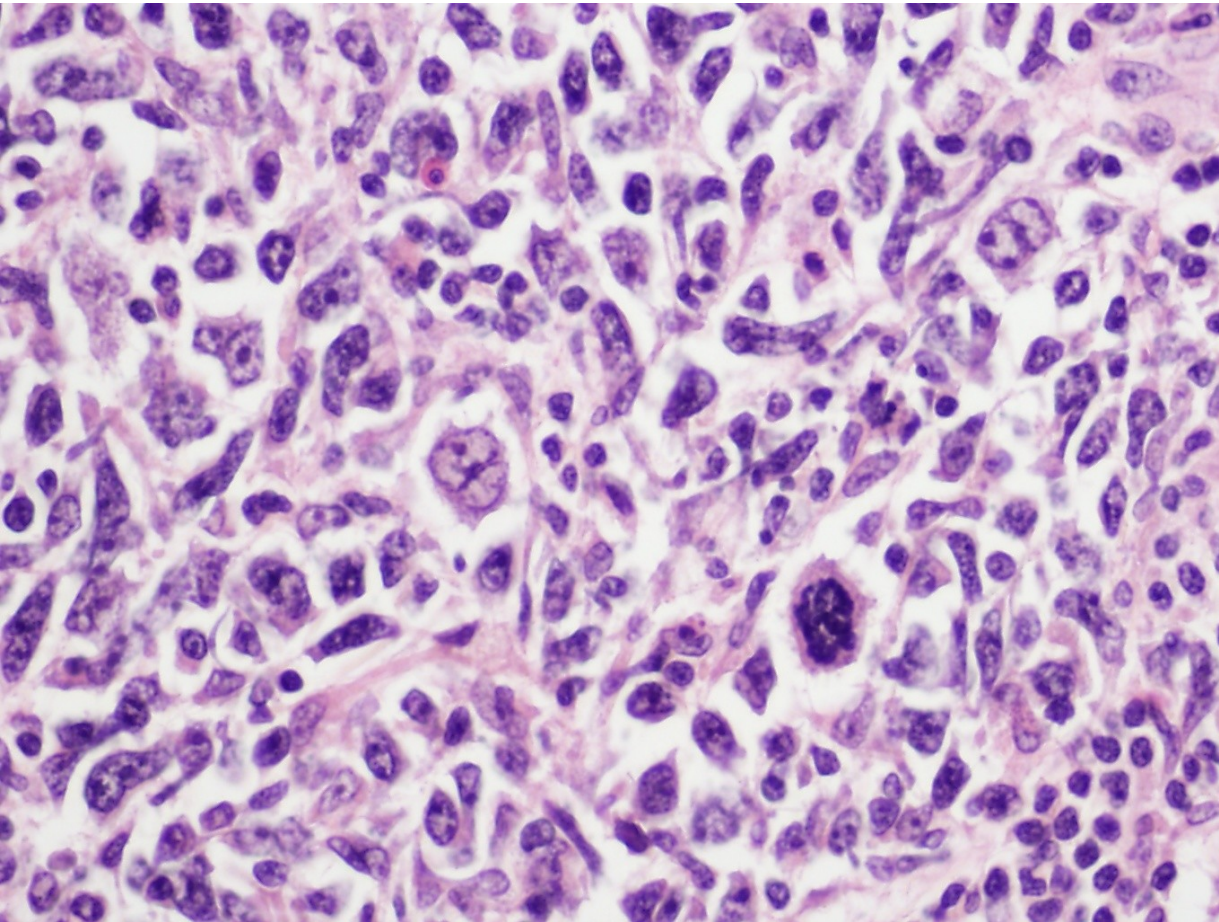


Fig. 4 – Pozitivní exprese Bcl-6 (jádro), zvětšení 400x

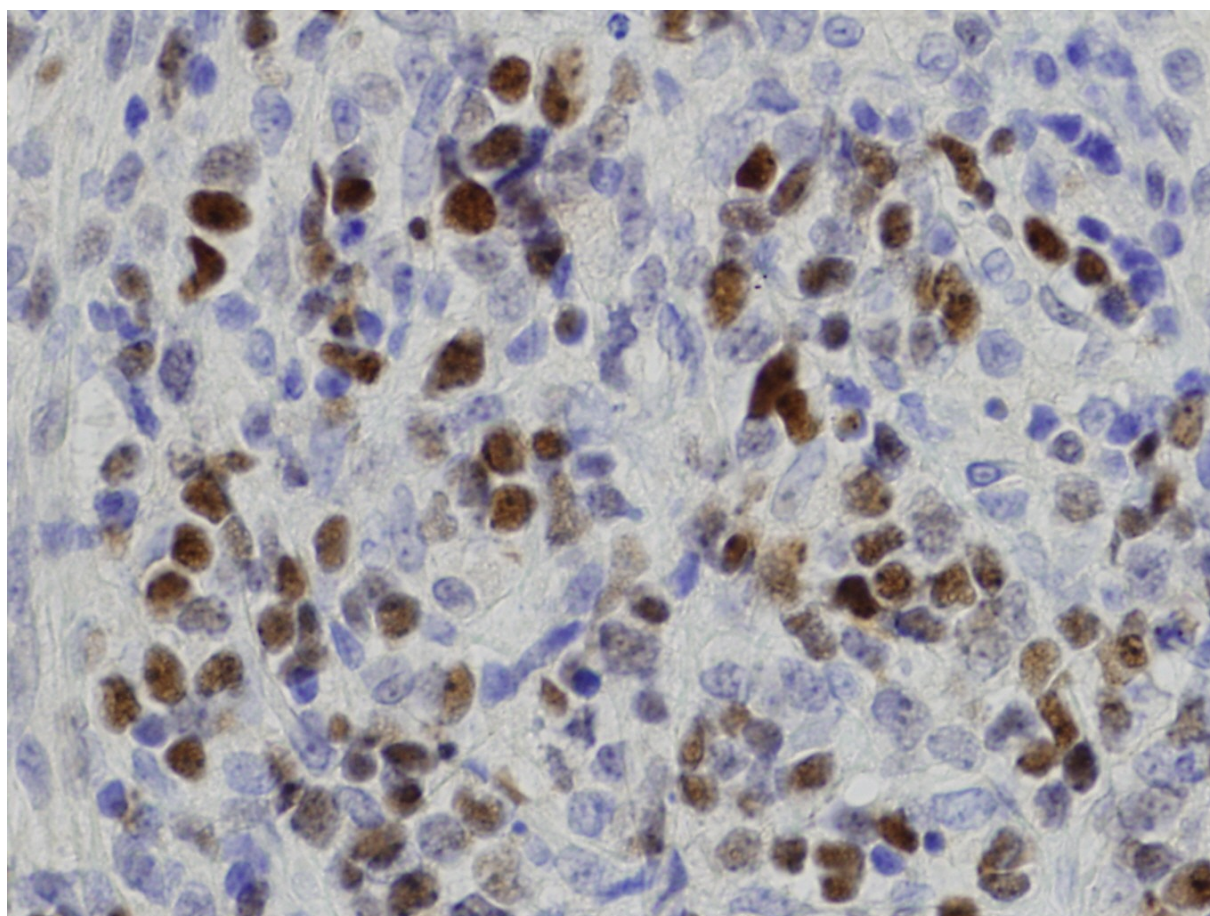


Fig. 5 – Pozitivní exprese CD10 (membrána), zvětšení 400x

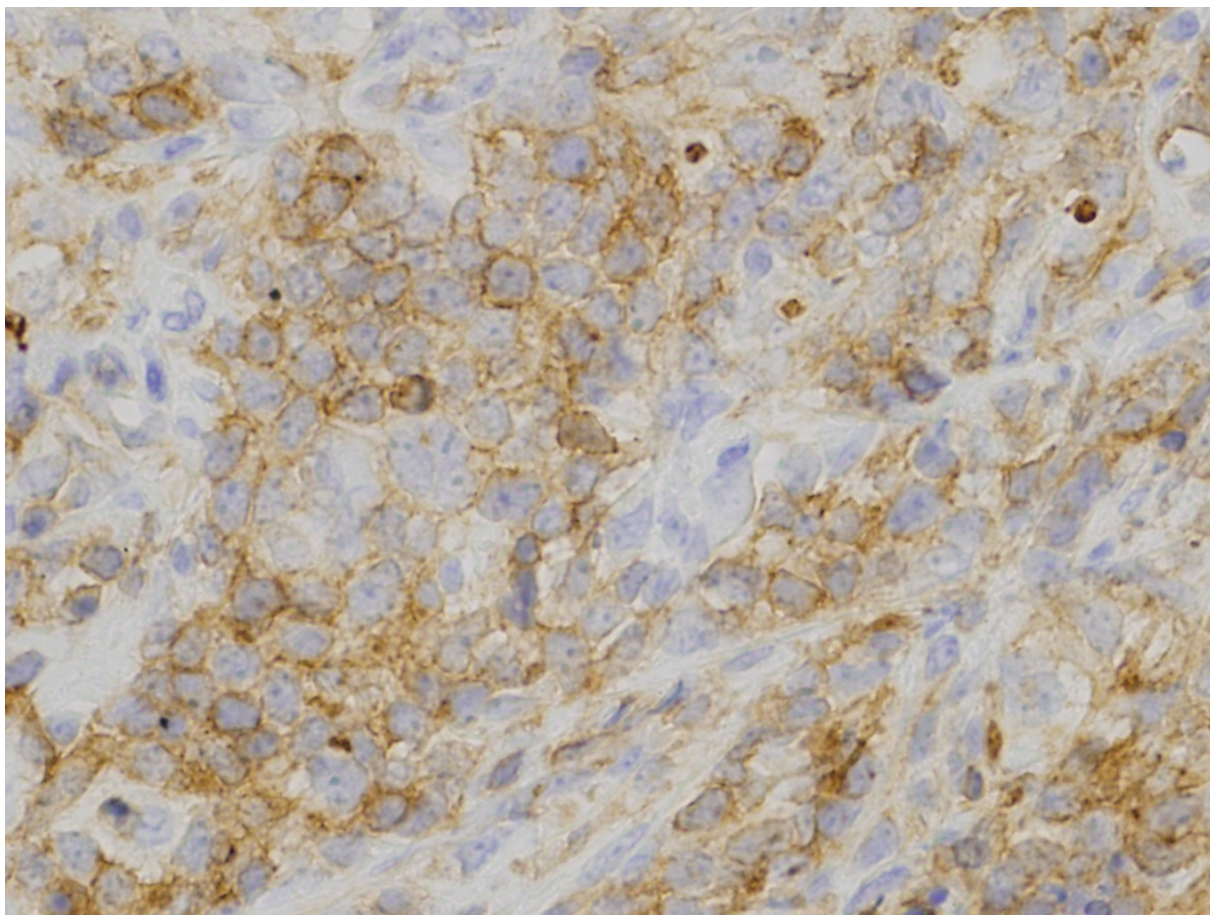


Fig. 6 – Pozitivní exprese MUM1/IRF4 (jádro), zvětšení 400x

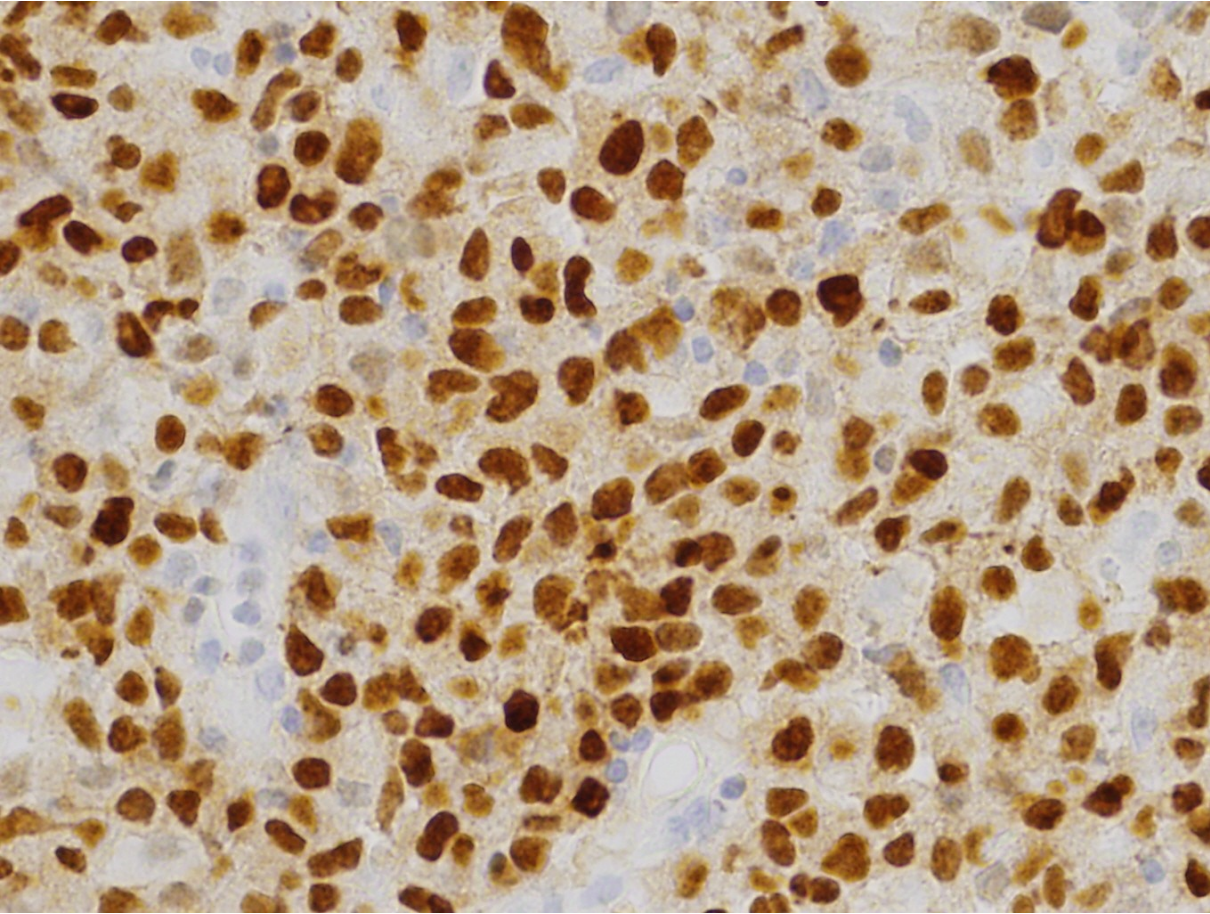




Fig. 7 – Pozitivní exprese Bcl-2 (cytoplazma), zvětšení 400x

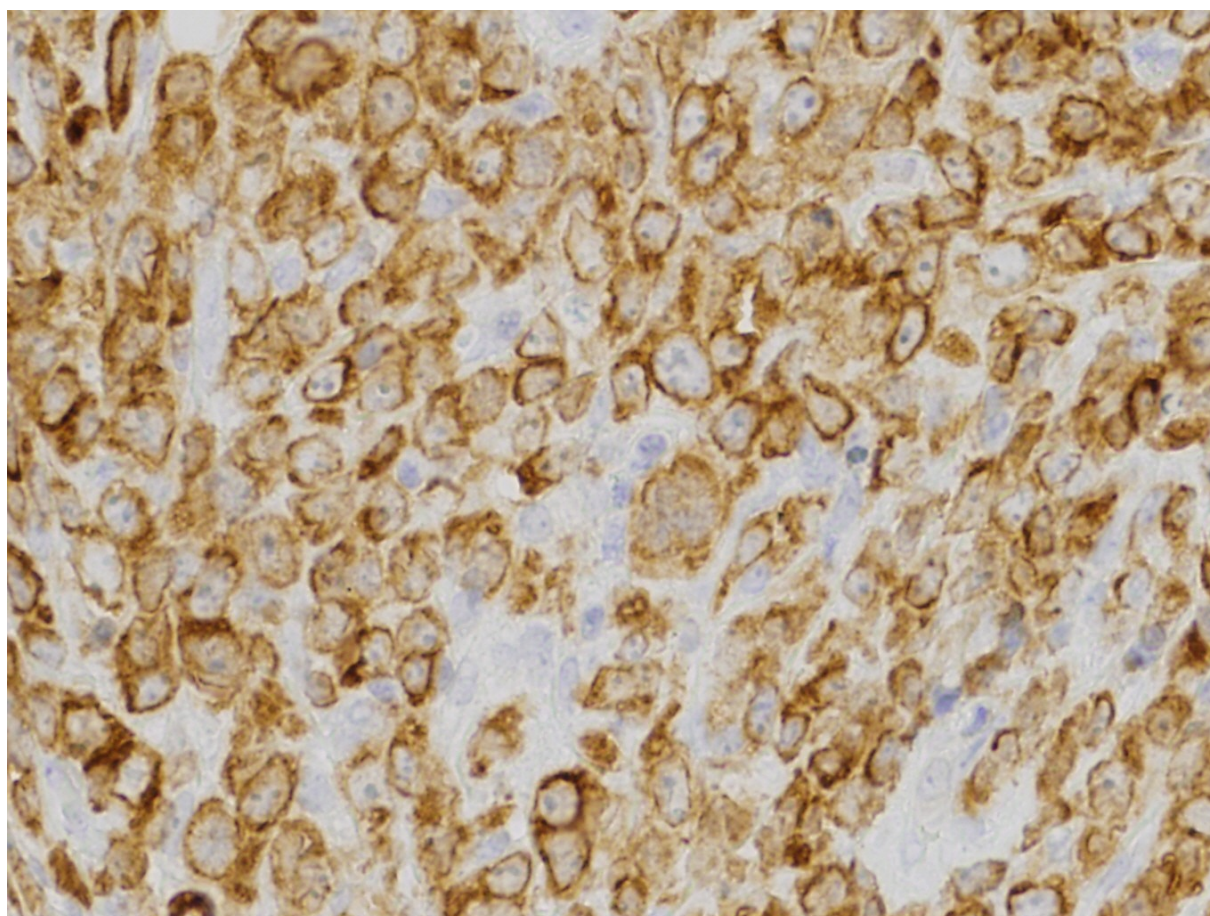


Fig. 8 – Pozitivní exprese p50 v jádře a cytoplasmě, zvětšení 400x

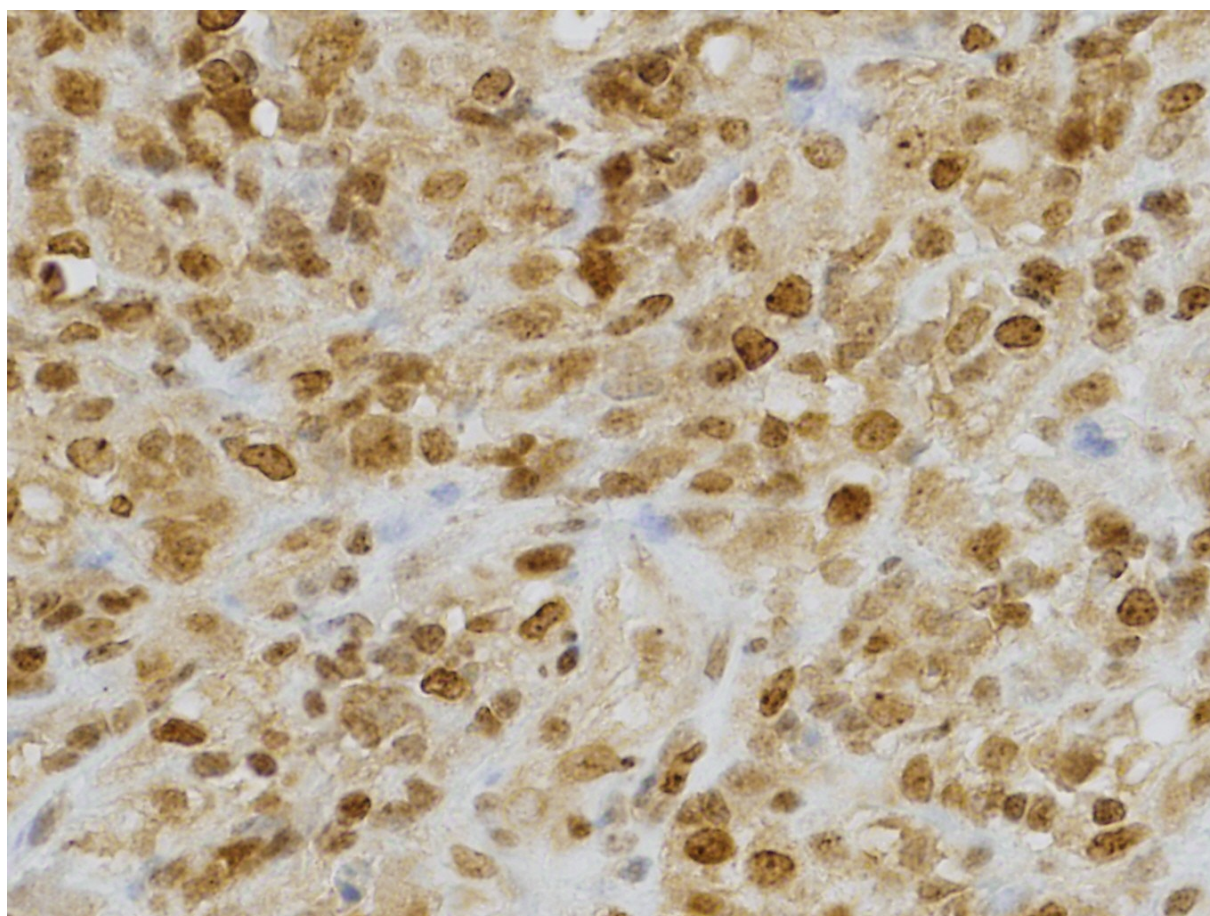


Fig. 9 – Pozitivní exprese p50 v cytoplazmě, zvětšení 400x

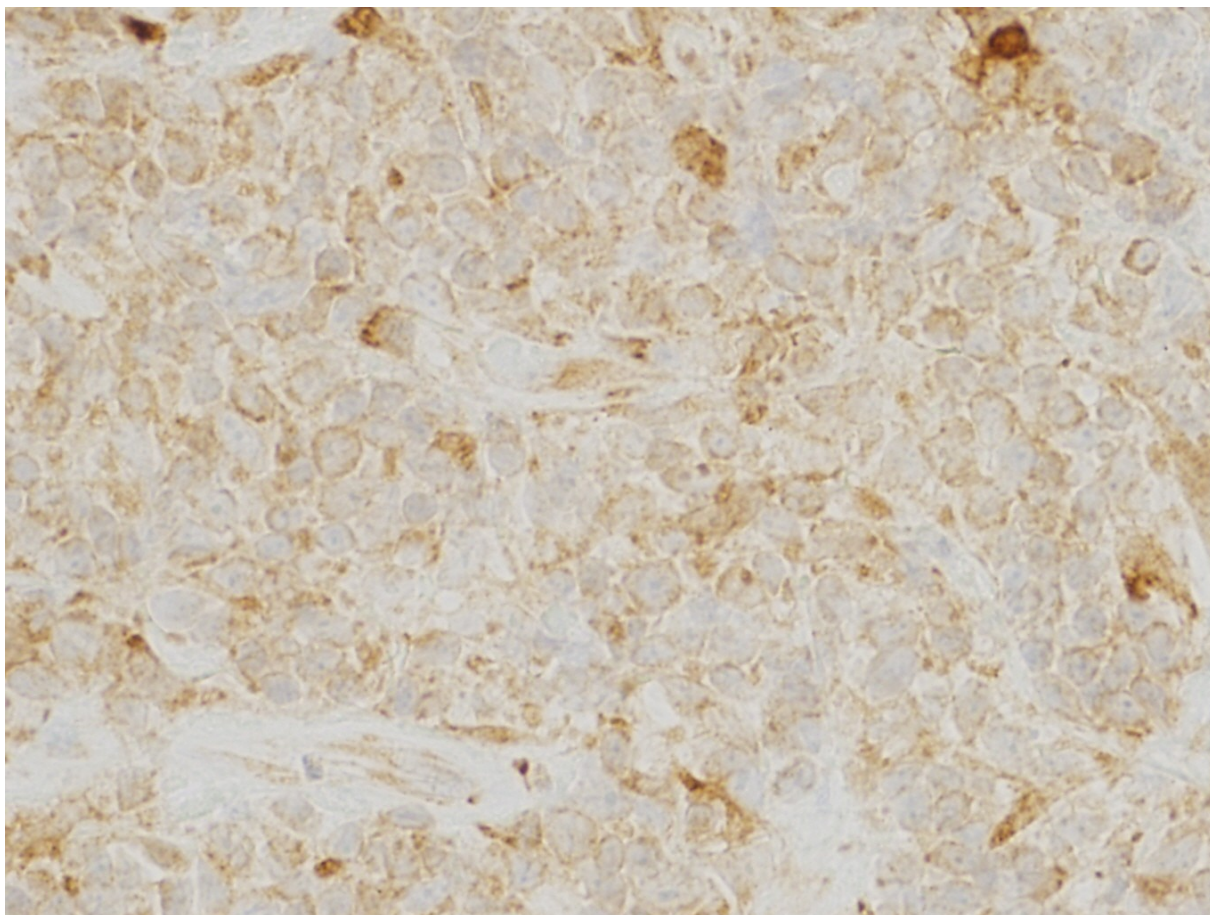


Fig. 10 – Pozitivní exprese p65 v jádře a cytoplasmě, zvětšení 400x

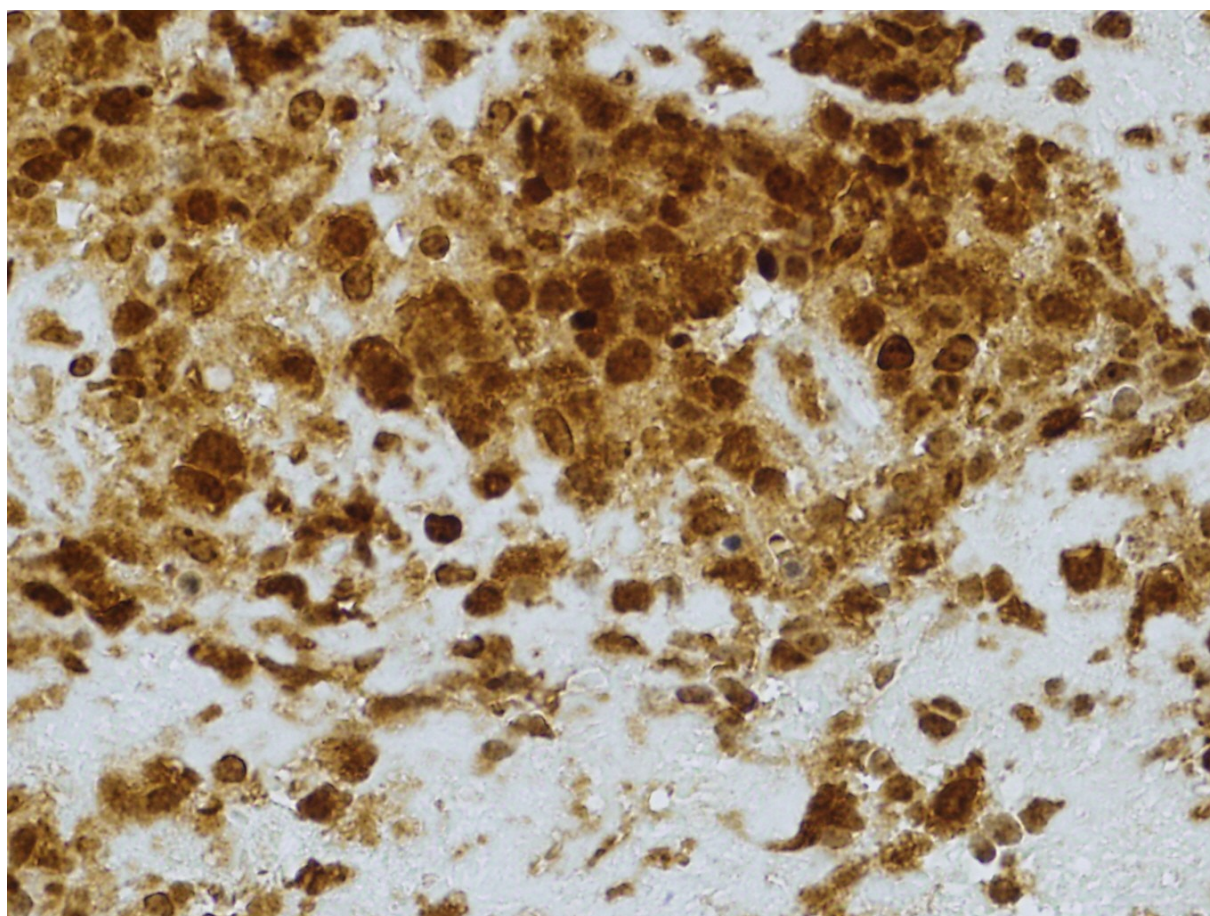


Fig. 11 – Pozitivní exprese Ki67, TMA, zvětšení 400x



#### 4. Výsledky studie:

Soubor 59 pacientů s 27 muži (45,76%) a 32 ženami (54,24%) s diagnózou DLBCL NOS (viz tab. 5), medián věku 64 (26-84) let, počet postižených uzlin dosahoval až 16 s mediánem 2 lymfatické uzliny. V souboru byly sledovány následující znaky - IPI, aa-IPI, periferní krevní obraz a některé z laboratorních hodnot, B-symptomy, postižení KD (trepanobiopsický vzorek), cytogenetické změny jednotlivých lymfomů (simplexní/komplexní karyotyp dle konvenční cytogenetiky), protokol použité chemoterapie a PS (viz tab. 2, 3), odpověď na terapii dle Cheson [Cheson et al. 1999] (tab. 11). U každého z pacientů byl vyšetřován imunohistochemický profil (IHC profil) dle výše uvedené IHC metodiky (tab. 6) a byly sledovány znaky CD10 (hodnoceno jako pozitivní s detekcí exprese 30% a více neoplastické populace), Bcl-6 (hodnoceno jako pozitivní s detekcí exprese 30% a více neoplastické populace), MUM1/IRF4 (hodnoceno jako pozitivní s detekcí exprese 30% a více neoplastické populace), Bcl-2 (hodnoceno jako pozitivní s detekcí hladin positivity exprese 5-9%, 10-

29%, 30% a více neoplastické populace), Ki67 detekovaná pozitivita je uváděna v procentech, min. 40% pozitivita Ki67 byla diskriminační pro diagnózu DLBCL NOS, a sledována byla hladina pod 70% (40-69%), nad 70% do 89% a nad 90% včetně. Hladina („cut-off point“) positivity u experimentálního sledování exprese proteinů p50, p52, p65 nebyla stanovena, uvádí se v detekovaném % pozitivních buněk. Jadernou pozitivitu p50 vykazovalo 17 případů (28,81%), pozitivitu p65 pouze jeden případ (1,69%) a nebyla zaznamenána pozitivita p52. Výsledky všech imunohistochemicky sledovaných znaků viz tab. 7. Dle Hans classifier [Hans et al., 2004] bylo možné selektovat 31 GCB-like DLBCL a 17 nonGCB-like DLBCL, v 11 případech (18,65%) nebylo možné jednoznačné zařazení ani do jedné ze skupin (viz tab. 8). Nejpočetnější stádium dle Ann Arbor stážovacího systému bylo stádium IV (40,68%, viz tab. 4). Byla sledována morfologie neoplastické populace (centroblastická, imunoblastická, anaplastická) a korelována k proliferační aktivitě a znaku CD30 bez známek statisticky významné signifikance. Znaky Bcl-2, Bcl-6, CD10, MUM1/IRF4, CD30, Ki67, p50, p65 a rozdělení na skupiny GCB-like a nonGCB-like byly vztaženy k celkovému přežití (OS) a doby do progresu choroby (PFS). Statisticky signifikantní byl rozdíl doby do progresu a v počtu relabujících/progredujících případů s CD10 pozitivní a negativní expresí (viz graf 2 a tab. 9,  $p < 0,04$ , resp.  $p < 0,025$ ). Statisticky signifikantní byl rozdíl doby do progresu a v počtu relabujících/progredujících případů u GCB-like a nonGCB-like/„třetí“ podskupiny DLBCL NOS (viz graf 4 a tab. 10,  $p < 0,035$ , resp.  $p < 0,04$ ). U všech relabujících případů ( $n=11$ ) byla zjištěna negativita CD10 a 28 případů bez relapsu vykazovalo pozitivitu CD10. Většina GCB-like případů ( $n=26$ ) byla bez známek progresu onemocnění, pouze 11 případů nonGCB-like nevykazovalo progresi a zároveň i progresu u této podskupiny byla čtenější ( $n=5$  u nonGCB-like versus  $n=2$  u GCB-like). Nezařaditelné případy do GCB a nonGCB-like podskupiny („třetí“ skupina, 18,65%) měly velmi podobnou křivku PFS jako podskupina nonGCB-like a statisticky nesignifikantně horší křivku OS (viz graf 4). Lepší odpověď na chemoterapii (CR) blíží se statistické signifikanci ( $p < 0,07$ ) vykazovaly případy Bcl-2 pozitivní s pozitivitou nad 30% včetně ( $n=30$ ) a pouze v osmi případech byla zjištěna PR a ve čtyřech případech PD (tab. 11). U identické hladiny positivity Bcl-2 (nad 30%) byly detekovány statisticky nesignifikantně vyšší intervaly OS a PFS (graf 1), tedy delší interval celkového přežití a doby do progresu ( $p < 0,19$ , resp.  $p < 0,11$ ). Vyšší leukocytóza byla statisticky nesignifikantně spojena s pozitivitou Bcl-6 (tab. 12, graf 6) a s expresí p50 (tab. 13, graf 7). Vyšší hladina lymfocytózy vykazovala statisticky signifikantní korelaci s pozitivitou CD10 (tab. 14, graf 8,  $p < 0,045$ ) a statisticky nesignifikantní korelaci s negativitou CD30 (tab. 15, graf 9,  $p < 0,08$ ). Vyšší hladiny IL-2 byly detekovány u případů s proliferační aktivitou Ki67 vyšší než 90% (graf 12,  $p < 0,075$ ). Statisticky nesignifikantní byla vyšší hladina LDH u případů p50 negativních (tab. 18,  $p < 0,08$ ). Statisticky nesignifikantní lepší OS a PFS vykazovaly případy s vyšší úrovní proliferační aktivity dle indexu Ki67 (s pozitivou více než 70%) v porovnání s detekovanou nižší proliferační aktivitou dle indexu Ki67 (s pozitivou pod 70%) (graf 3,  $p < 0,4$ , resp.  $p < 0,82$ ). Statisticky nesignifikantní vztah

vykazovala exprese p50 a zjištěný OS/PFS (graf 5,  $p < 0,60$ , resp.  $p < 0,73$ ). Statisticky signifikantně vyšší hladina s-TK byla detekována u případů DLBCL NOS s pozitivitou Bcl-2 vyšší než 5% (tab. 16, graf 10,  $p < 0,03$ ). Negativní exprese MUM1/IRF4 vykazovala statisticky signifikantní vyšší hladinu  $\beta 2$  mikroglobulinu (tab. 17, graf 11,  $p < 0,003$ ). Interval minima a maxima počtu pozitivních lymfatických uzlin vykazoval největší rozptyl u GCB-like podskupiny a zúžování v porovnání mezi podskupinami (v tomto pořadí) DLBCL NOS GCB-like, nonGCB-like a „třetí“ podskupinou s tím, že medián počtu pozitivních lymfatických uzlin byl nejnižší u GCB-like podskupiny a nejvyšší u nonGCB-like (graf 15,  $p < 0,09$ ). Nicméně statisticky signifikantní rozdíl v počtu pozitivních lymfatických uzlin byl detekován pouze mezi skupinou GCB- a nonGCB-like DLBCL NOS (tab. 19, graf 13,  $p < 0,045$ ). Statisticky nesignifikantně vyšší hladina trombocytózy a vyšší hladina leukocytózy blížící se statistické signifikanci byla detekována u podskupiny GCB-like (graf 14, 16,  $p < 0,08$ , resp.  $p < 0,055$ ) a současně byl zjištěn i nejvyšší rozptyl intervalu úrovně trombocytózy a leukocytózy u téže podskupiny vzhledem k nonGCB-like ( $p < 0,055$ ) a „třetí“ ( $p = 0,05$ ) podskupině DLBCL NOS. Využitá byla i metoda tkáňové mikroarray (TMA), avšak vzhledem k nezískání optimálního počtu a objemu reprezentativní tkáně s přítomností DLBCL NOS nebyla dosažena úroveň pro korektní statistické zhodnocení.

Tab. 7 - Imunohistochemická data zpracovaného souboru (imunohistochemicky detekována exprese sledovaných znaků)

		N	%
Bcl2	$\geq 5\%$	52	88,14%
	$< 5\%$	7	11,86%
Bcl2	$\geq 10\%$	50	84,75%
	$< 10\%$	9	15,25%
Bcl2	$\geq 30\%$	46	77,97%
	$< 30\%$	13	22,03%
Bcl6	negativní	23	38,98%
	pozitivní	36	61,02%

CD10	negativní	41	69,49%
	pozitivní	18	30,51%

Tab. 7 - Imunohistochemická data zpracovaného souboru (imunohistochemicky detekována exprese sledovaných znaků) - pokračování

		N	%
CD30	negativní	43	72,88%
	pozitivní	16	27,12%
MUM1	negativní	34	57,63%
	pozitivní	25	42,37%
Ki67	<70%	10	16,95
	70--90%	20	33,9
	>=90%	29	49,15
p65	negativní	58	98,31%
	pozitivní	1	1,69%
p50	negativní	42	71,19%
	pozitivní	17	28,81%

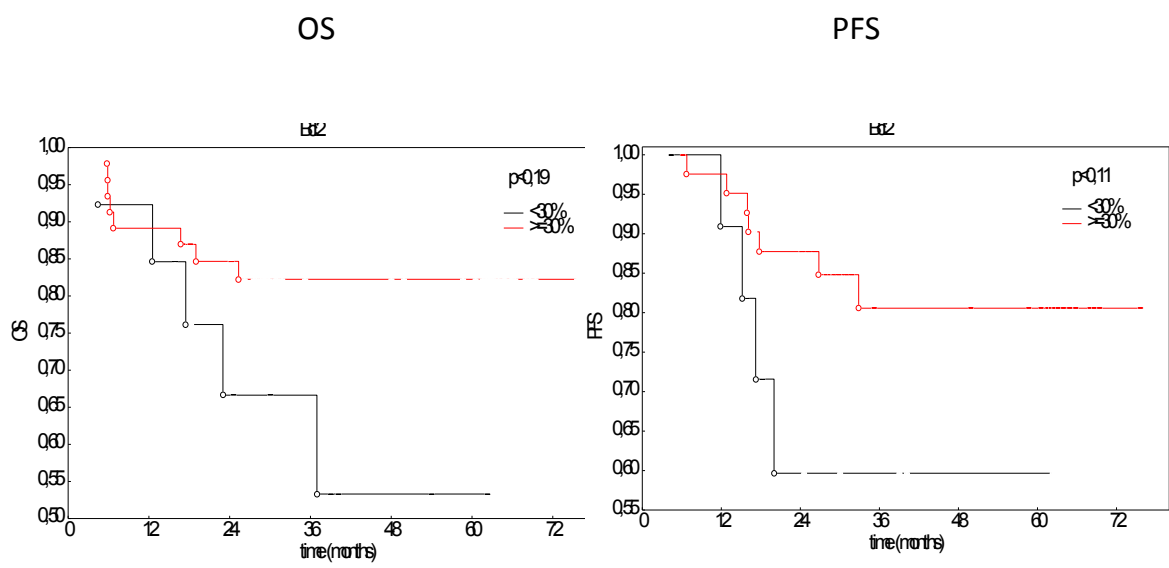
Tab. 8 - DLBCL podskupiny dle „Hans classifier“ [Hans et al., 2004]

GCB-like	31	52,54%
NonGCB-like	17	28,81%
Negativní „třetí“	11	18,65%



podskupina	
------------	--

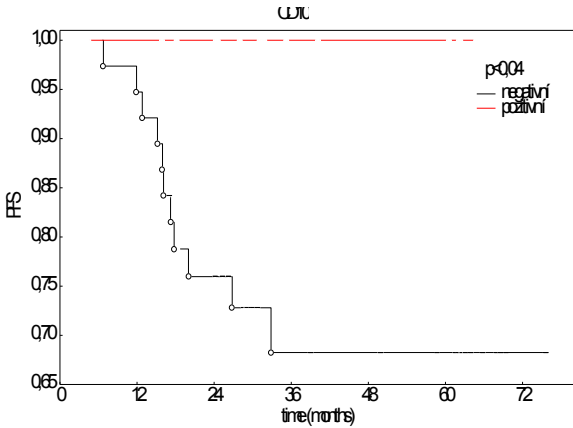
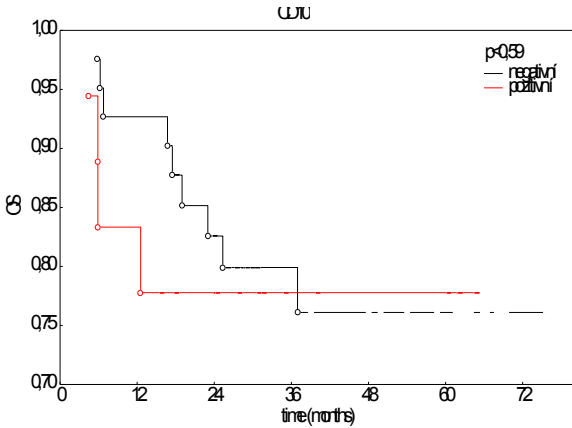
Graf 1 - OS a PFS v korelaci k expresi Bcl2



Graf 2 - OS a PFS v korelaci k expresi CD10

# OS

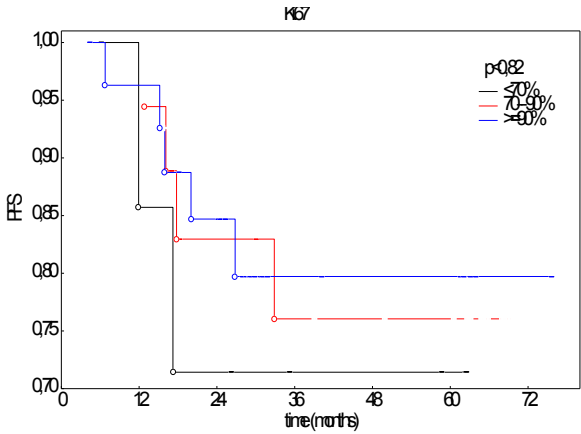
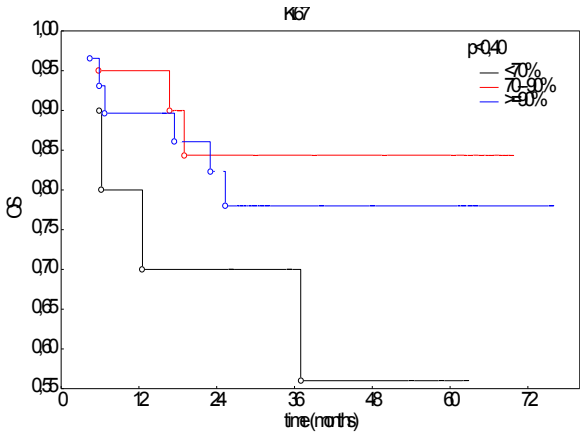
# PFS



Graf 3 - OS a PFS v korelaci k proliferačnímu indexu Ki67

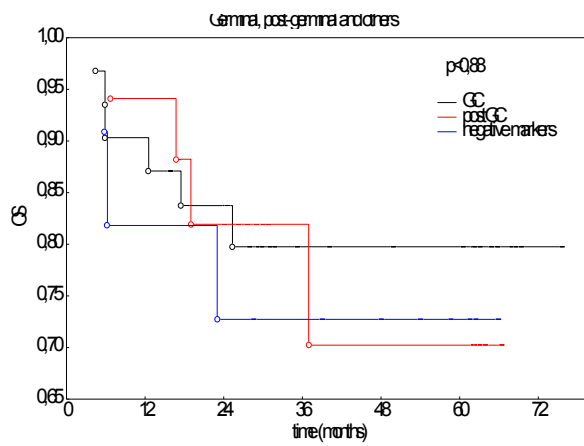
# OS

# PFS

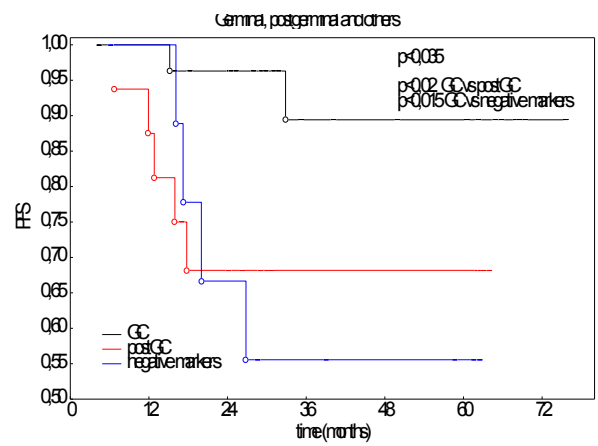


Graf 4 - OS a PFS v korelaci k GCB, nonGCB-like a "třetí" podskupině DLBCL

# OS



# PFS



Tab. 9 - Korelace exprese CD10 k relapsu či progresi onemocnění

		CD10		celkově
		negativní	pozitivní	
relaps/progrese	ano	11	0	11
	ne	28	15	43
celkově		39	15	54

**p<0,025**

Tab. 10 - GCB/nonGCB-like/“třetí” podskupina DLBCL v korelaci k relapsu či progresi onemocnění

		GCB nonGCB “třetí”			celkově
		GCB	nonGCB	“třetí”	
relaps/progrese	ano	2	5	4	11
	ne	26	11	6	43
celkově		28	16	10	54

**p<0,04**

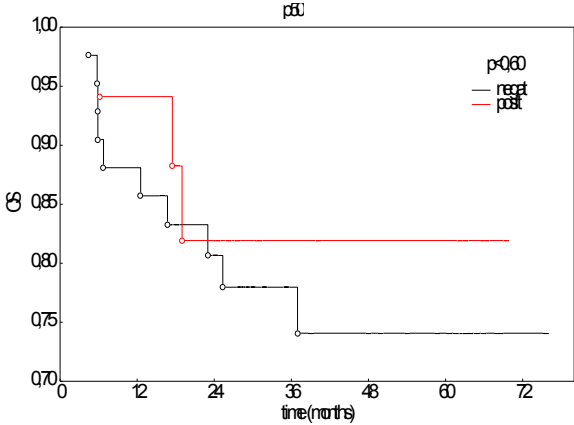
Tab. 11 - Korelace exprese Bcl-2 a odpověď na CHT (odpověď na terapii hodnocena dle Cheson et al.)

		Bcl2 exprese		celkově
		<30%	>=30%	
CHT odpověď	SD	1	0	1
	CR	6	30	36
	PR	5	8	13
	PD	0	4	4
	celkově	12	42	54

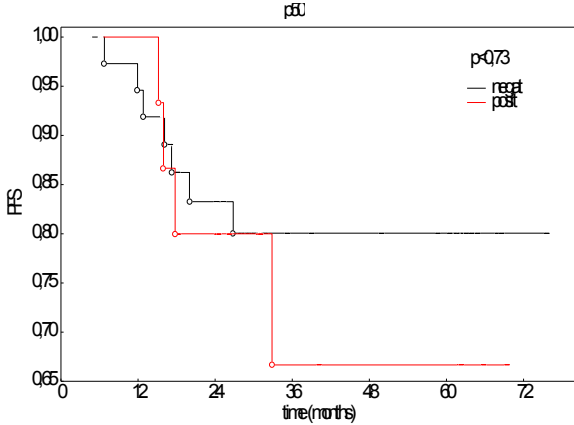
Zkratky: SD – stabile disease, CR – complete remission, PR – partial remission, PD – progressive disease

Graf 5 - OS/PFS a exprese p50

# OS



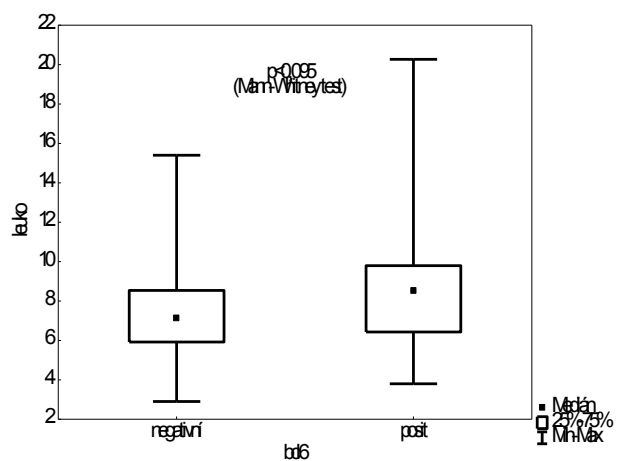
# PFS



Tab. 12, graf 6 - Korelace exprese Bcl-6 a leukocytózy

# Bcl6

	N negat	N posit	p-value (Mann- Whitney)
věk	23	36	0,196018
Počet postiž. uzlin	23	36	0,318807
max. rozměr tu/cm	19	32	0,735555
Hb	23	36	0,627069
<b>leuko</b>	<b>23</b>	<b>36</b>	<b>0,094968</b>
trombo	23	36	0,134491
lymfo	23	36	0,296693
B2M	21	30	0,857035
s-TK	23	35	0,647381
Ca 125	20	29	0,709267
IL-2	13	15	0,963860
rIL-2	17	24	0,723868
IPI	23	36	0,694153
aa-IPI	15	23	0,496848

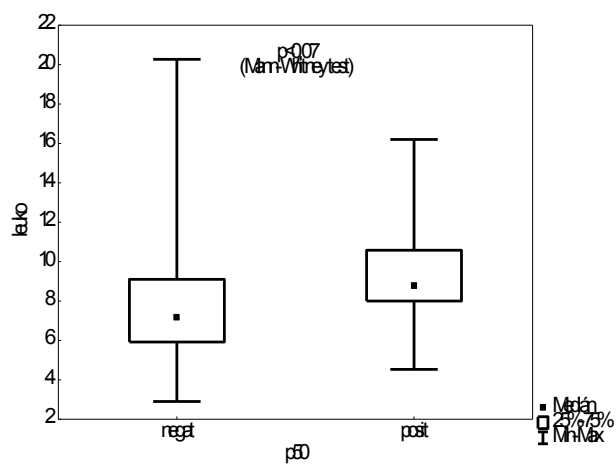




Tab. 13, graf 7 - Korelace exprese p50 a leukocytózy

# p50

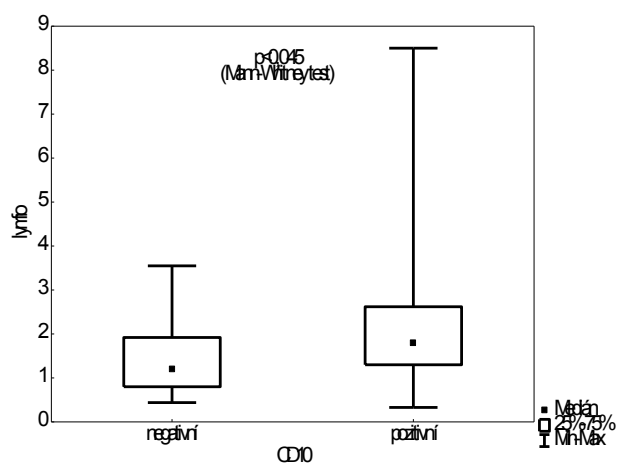
	N negat	N posit	p-value (Mann-Whitney)
věk	42	17	0,208530
Počet postiž. uzlin	42	17	0,966956
max. rozměr tu/cm	35	16	0,328449
Hb	42	17	0,940559
<b>leuko</b>	<b>42</b>	<b>17</b>	<b>0,066519</b>
trombo	42	17	0,797259
lymfo	42	17	0,153770
B2M	35	16	0,943969
s-TK	41	17	0,415901
Ca 125	34	15	0,296308
IL-2	19	9	0,663830
rIL-2	28	13	0,397692
IPI	42	17	0,746519
aa-IPI	26	12	0,816401



Tab. 14, graf 8 - Korelace exprese CD10 a lymfocytózy

# CD10

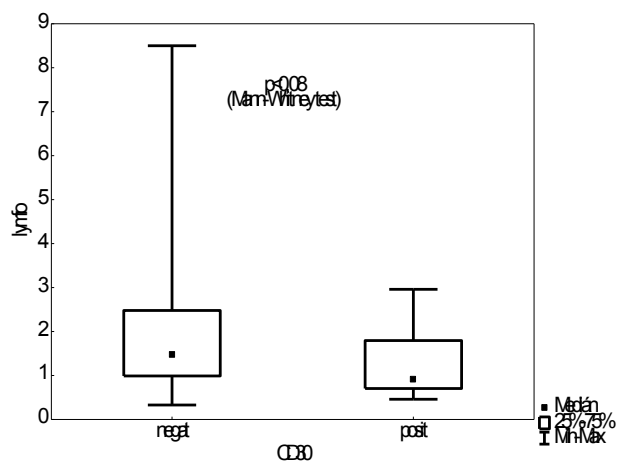
	N negat	N posit	p-value (Mann- Whitney)
věk	41	18	0,235057
Počet postiž. uzlin	41	18	0,762854
max. rozměr tu/cm	36	15	0,942972
Hb	41	18	0,725813
leuko	41	18	0,262129
trombo	41	18	0,595838
<b>lymfo</b>	<b>41</b>	<b>18</b>	<b>0,044770</b>
B2M	35	16	0,636737
s-TK	41	17	0,359780
Ca 125	33	16	0,547339
IL-2	21	7	0,755748
rIL-2	30	11	0,476596
IPI	41	18	0,762854
aa-IPI	25	13	0,855500



Tab. 15, graf 9 - Korelace exprese CD30 a lymfocytózy

# CD30

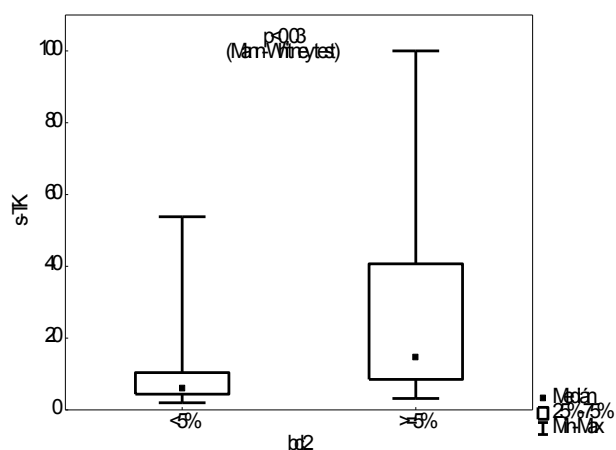
	N negat	N posit	p-value (Mann-Whitney)
věk	43	16	0,504462
Počet postiž. uzlin	43	16	0,560040
max. rozměr tu/cm	36	15	0,329913
Hb	43	16	0,297619
leuko	43	16	0,606497
trombo	43	16	0,238684
<b>lymfo</b>	<b>43</b>	<b>16</b>	<b>0,080474</b>
B2M	37	14	0,609019
s-TK	42	16	0,412421
Ca 125	36	13	0,211653
IL-2	19	9	0,356803
rIL-2	30	11	0,827901
IPI	43	16	0,899296
aa-IPI	29	9	0,787294



Tab. 16, graf 10 - Korelace exprese Bcl-2 a s-TK

## Bcl2, hranice 5%

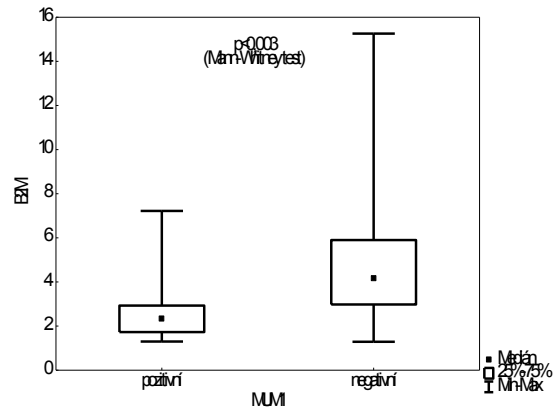
	N <5%	N ≥5%	p-value (Mann-Whitney)
věk	7	52	0,512224
Počet postiž. uzlin	7	52	0,621488
max. rozměr tu/cm	7	44	0,311899
Hb	7	52	0,282394
leuko	7	52	0,845465
trombo	7	52	0,400330
lymfo	7	52	0,774325
B2M	6	45	0,321752
<b>s-TK</b>	<b>7</b>	<b>51</b>	<b>0,027573</b>
Ca 125	6	43	0,917149
IL-2	4	24	0,824811
rIL-2	5	36	0,772038
IPI	7	52	0,303960
aa-IPI	5	33	0,556610



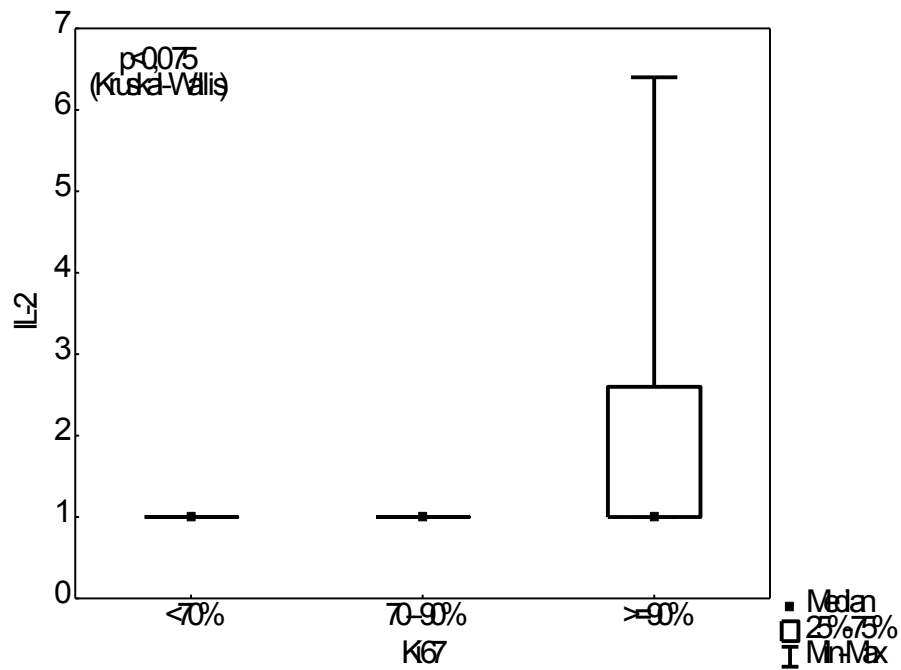
Tab. 17, graf 11 - Korelace exprese MUM1/IRF4 a  $\beta$ 2mikroglobulinu

# MUM1

	N posit	N negat	p-value (Mann-Whitney)
věk	25	34	0,423552
Počet postiž. uzlin	25	34	0,631480
max. rozměr tu/cm	20	31	0,163318
Hb	25	34	0,709172
leuko	25	34	0,642361
trombo	25	34	0,469167
lymfo	25	34	0,755009
<b>B2M</b>	<b>21</b>	<b>30</b>	<b>0,002746</b>
s-TK	25	33	0,839524
Ca 125	21	28	0,476767
IL-2	9	19	0,663830
rIL-2	18	23	0,594024
IPI	25	34	0,507502
aa-IPI	20	18	0,965442



Graf 12 - Korelace hladiny IL-2 a Ki67



Tab. 18 - Korelace hladiny LDH a exprese p50

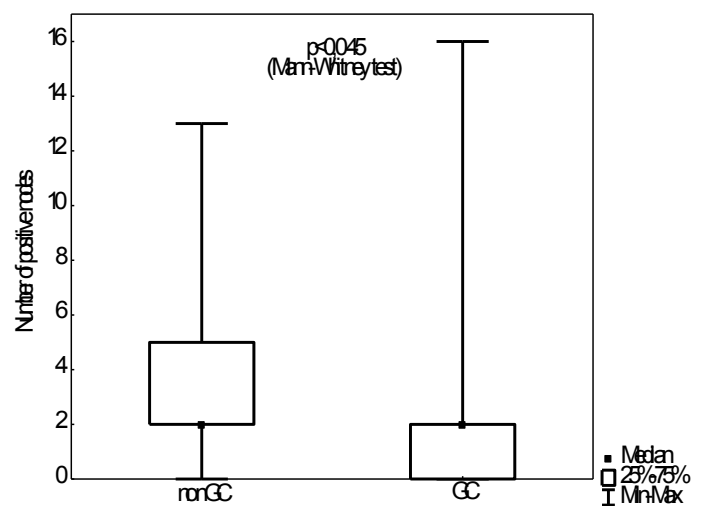
		p50		celkově
		negativní	pozitivní	
LDH	zvýšená	23	5	28
	snížená	19	12	31
celkově		42	17	59

**p<0,08**

Tab. 19, graf 13 – Korelace počtu pozitivních LU/trombocytózy a GCB/nonGCB-like podskupiny DLBCL NOS

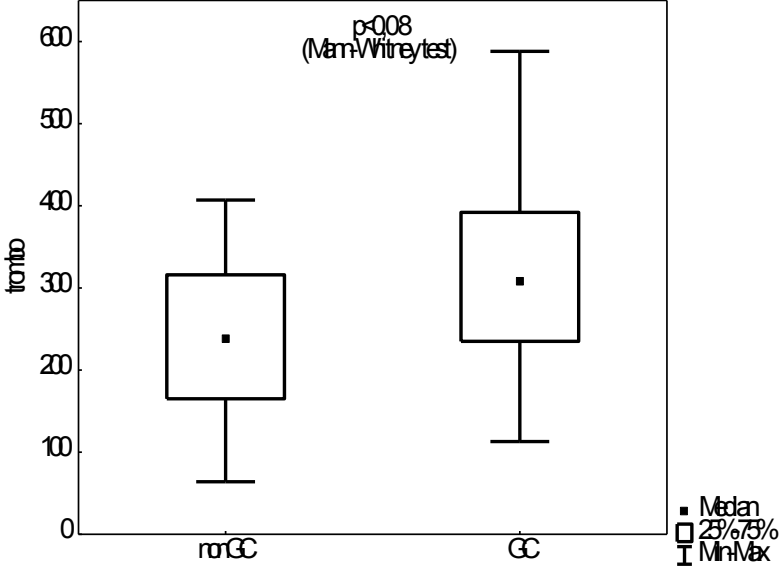
## GCB/nonGCB-like

	N nonGCB	N GCB	p-value (Mann-Whitney)
věk	17	31	0,150008
<b>Počet postiž. uzlin</b>	<b>17</b>	<b>31</b>	<b>0,041875</b>
max. rozměr tu/cm	15	27	0,697116
Hb	17	31	0,521682
leuko	17	31	0,304160
<b>trombo</b>	<b>17</b>	<b>31</b>	<b>0,076980</b>
lymfo	17	31	0,132325
B2M	15	26	0,253329
s-TK	17	30	0,238951
Ca 125	15	25	0,638731
IL-2	6	16	0,857733
rIL-2	12	22	0,873084
IPI	17	31	0,732816
aa-IPI	13	19	0,791267



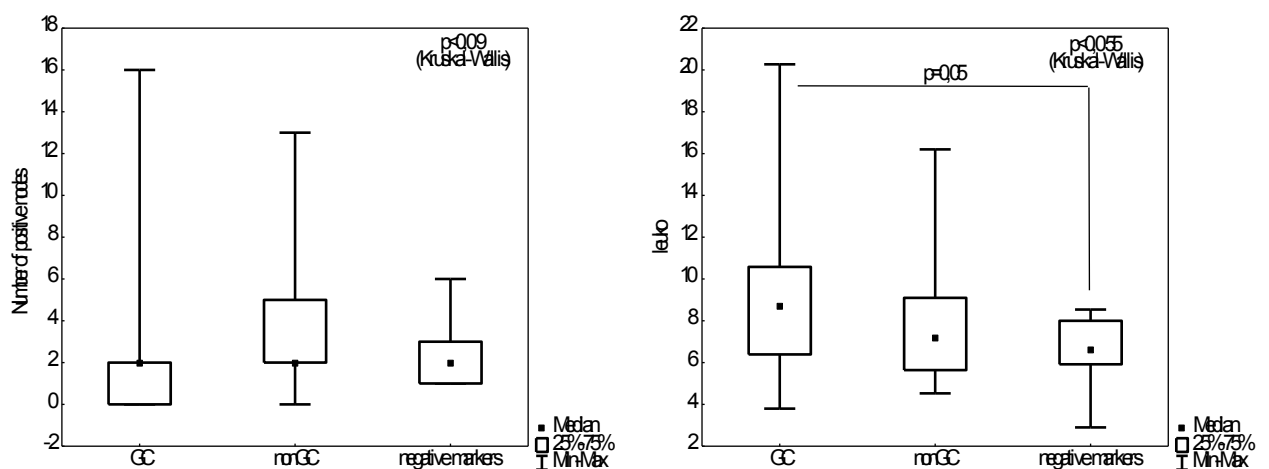
Graf 14 - Korelacje trombocytózy a GCB/nonGCB-like podskupiny DLBCL NOS

# GCB/nonGCB-like



Graf 15, 16 - Korelace počtu pozitivních LU/leukocytózy a GCB/nonGCB-like/“třetí“ podskupiny DLBCL NOS

## GCB/nonGCB-like/“third“ subgroup



### 5. Diskuze

Již od prvopočátků vývoje klasifikačních schémat maligních lymfoproliferativních a potažmo hematologických onemocnění je velmi dobře známo, že postupně separátně vytvářené diagnostické jednotky včetně rozsáhlé skupiny DLBCL nejsou zcela uniformními a jejich heterogenita se odráží na všech diagnostických úrovních – klinické, morfologické, laboratorní a molekulární. Navíc zcela unikátní vývoj daného konkrétního lymfoproliferativního onemocnění v čase a v odpovědi na aplikovanou terapii musí být brán vždy na zřetel. Prognostická a prediktivní stratifikace DLBCL vzhledem ke genové expresní analýze (GEP) je velmi dobře známa a plně akceptována [Alizadeh et al., 2000, Rosenwald et al., 2002], nicméně není široce aplikována v běžné rutinní praxi vzhledem k finanční náročnosti. Proto jsou i nadále hledány dostupnější racionálnější metodické postupy a algoritmy se vztahem k prognóze popř. i k možnému stanovení predikce na terapii.



Imunohistochemie patří k široce dostupným a dobře zavedeným známým metodám, která vykazuje přibližně 80% konkordanci s GEP při využití algoritmu dle Hans [Hans et al., 2004] a přibližně 93% konkordanci s GEP při využití postupu dle Choi [Choi et al., 2009], navíc v analyzovaném vzorku můžeme určit topografii detekované pozitivní exprese (neoplastická lymfoidní populace versus non-neoplastické milieu). Konkrétně imunohistochemické dělení DLBCL na podskupiny hraje důležitou roli nejen v odlišování "GCB-like" a "nonGCB-like", ale i jednotlivá pozitivita exprese CD5 či c-Myc je nepříznivým prognostickým faktorem [WHO 2008, Klapper et al., 2008] u *de novo* DLBCL. CD40 a CD23 exprese je naopak prognosticky příznivým znamením a je pravděpodobně spojena s histogenetickým původem neoplastických buněk z GC (u CD40+ přibližně 76%), resp. preGC nebo časným GC původem (u CD23+ přibližně 16%) a navíc je též spojena s vyšší stupněm apoptózy vzhledem k indukci genu bax nebo zesílené interakci s T-buněčným milieu [211]. Většina DLBCL nodálních i extranodálních vykazuje expresi Bcl-6 s tím, že cut-off bylo stanoveno variabilně od 10% po 30% [de Leval et al., 2003, Hans et al., 2004]. Pozitivita Bcl-6 může u DLBCL reflektovat histogenetický původ z GC nebo deregulaci translokací (přibližně 40% případů) či mutací 5' nontranslačního regulačního regionu [Butler et al., 2002, Lo Coco et al., 1994, Capello et al. 2000, Artiga et al., 2002, Ye et al., 1995]. Dřívější nejednoznačnost zařazení pozitivní exprese Bcl-6 k pozitivnímu, negativnímu či neutrálnímu prognostickému významu/faktoru [Lo Coco et al., 1994, Jerkeman et al., 2002, Bastard et al., 1994, Barrans et al., 2002] byla (vyřešena sofistikovanějším hodnocení v rámci již výše zmíněného algoritmu dle Hansové [Hans et al., 2004] nebo novějšího algoritmu dle Choi [Choi et al., 2009], které se více přiblížily biologické realitě a GEP DLBCL NOS. Také detekovaný translokační partner pro Bcl-6 nese prognostický význam, který je u non-Ig translokací negativní oproti Ig translokacím. Zjistěná spojitost exprese Bcl-6 s delším přežíváním je nejspíše vázána na vyšší senzitivitu neoplastické populace k apoptóze. Exprese znaku CD10 je téměř ve všech případech DLBCL doprovázena expresí Bcl-6, nicméně tato koexprese není vázána reverzně [de Leval et al., 2003]. Pozitivní exprese MUM1/IRF4 v minimálně 30% neoplastických buněk DLBCL je asociována se signifikantně horší prognózou [Hans et al., 2004]. Dalším z nepříznivých prognostických faktorů je aktivace signální dráhy NFκB, konstitutivní aktivace této dráhy se předpokládá u ABC-typu DLBCL [Davis et al., 2001]. Obecně typ DLBCL s aktivovanou signální dráhou NFκB náleží v klinickém obraze k biologicky agresivnějším formám DLBCL a analýza NFκB aktivace může být využita i k případné cílenější terapii bortezomibem (inhibitor proteazomového komplexu). Případy DLBCL NOS s detekovanou pozitivní expresí p50 a p65 nevykazovaly v naší studii statisticky signifikantní korelaci se sledovanými znaky včetně OS/PFS, nicméně i přesto byly imunohistochemické známky NFκB aktivace v souboru DLBCL NOS detekovány a příslušní pacienti by tak mohli z cílené inhibice této signální dráhy profitovat. Otázkou je však možný biologický význam získaných výsledků vzhledem ke

komplexnosti regulace signální dráhy NFκB a bude tudíž zapotřebí širší analýza. Základní součástí signální dráhy NFκB je pět monomerů p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 a p52. Zásadním členem signální dráhy NFκB je heterodimer p65/p50, jehož monomer p65 obsahuje transaktivační doménu (doména stimulující transkripci), která je lokalizovaná na C konci Rel homologní domény [Hou et al., 2003]. Transaktivační doména není součástí monomeru p50, který nese úlohu vazebně regulační k DNA [Perkins et al., 1992, Ballard et al., 1992]. Vazba proteinu p50 na DNA ve formě monomeru je spojena s fosforylací Ser<sup>65</sup>, Ser<sup>337</sup> a Ser<sup>342</sup>, které jsou pro tuto vazbu klíčové [Hou et al., 2003]. Protein p50 s fosforylovaným Ser<sup>337</sup> vykazuje nejvyšší vazebnou aktivitu k DNA, přičemž fosforylace Ser<sup>337</sup> je využívána i pro regulaci vazebné aktivity p50 k DNA [Hou et al., 2003]. Homodimer p50/p50 (s transrepresem p50) je negativním regulátorem NFκB aktivity při kompetici s heterodimerem p65/p50 (s transaktivátorem p50) o vazebná místa na DNA a přes svoji asociaci s korepresem histonovou deacetylázou (HDAC) [Ashburner et al., 2001, Zhong et al., 2002]. Protein p50 je tedy současně jak pozitivním, tak i negativním kontrolním či spíše souhrnně modulačním mechanismem NFκB aktivity a transkripce [Hou et al., 2003]. Jaderná lokalizace NFκB je regulována reverzibilní acetylací své podjednotky p65, kdy acetylovaná forma zabraňuje navázání IκB-α (podjednotka p65 zůstává v jádře), zatímco deacetylovaná forma p65 (pomocí HDAC) s navázaným IκB-α je z jádra exportována [Chen et al., 2001]. Hypofosforylovaná jednotka p50 je schopná translokace do jádra, nicméně NFκB zároveň postrádá vazebnou aktivitu k DNA [Kushner et al., 1999]. Při obnovení fosforylovaného stavu p50 si NFκB udržuje svoji vazbu k DNA [Hou et al., 2002]. Fosforylovaná forma jednotky p65 reguluje transkripční aktivitu NFκB přes svoji asociaci s koaktivátorem CBP/p300, kdežto nefosforylovaná forma p65 se váže s korepresem HDAC [Zhong et al., 1997, Zhong et al., 1998, Zhong et al., 2002]. Signální dráha NFκB je tedy velice filigránsky regulována specifickou fosforylací svých podjednotek, přičemž fosforylace p50 na Ser<sup>337</sup> je klíčová pro vazbu NFκB k DNA a fosforylace podjednotky p65 na Ser<sup>276</sup>, Ser<sup>529</sup> a Ser<sup>536</sup> je zásadní pro NFκB transaktivaci [Zhong et al., 1997, Zhong et al., 1998, Wang et al., 2000, Sizemore et al., 2000]. Další klíčovou analýzou by bylo odlišení izoforem sledovaných proteinů včetně wt (wilde type) a mutovaných forem s jejich možným biologickým impaktem. Nerovnováha mezi neoplastickou buněčnou proliferací a buněčnou smrtí je zcela univerzální znak většiny neoplazií a proto sledování proliferující frakce za pomoci anti-Ki67 (MIB-1) je dobrým diagnostickým a prognostickým znakem, který detekuje expresi proteinu ve všech fázích buněčného cyklu (G1 až M) kromě G0 fáze. Statisticky nesignifikantně lepší celkové přežití (OS) a období bez progresu (PFS) bylo zaznamenáno u případů DLBCL NOS s vyšší proliferací (proliferací index Ki67 více než 70%) v porovnání s případy s nižším proliferací indexem Ki67 pod 70% a to pravděpodobně vzhledem k lepší terapeutické odpovědi na aplikované chemoterapeutické protokoly u vysoce proliferujících DLBCL, které by ve svém přirozeném průběhu bez léčby spadaly do

podskupiny biologicky agresivnějších forem DLBCL. Nicméně prognostický význam proliferčního indexu Ki67 byl u proběhlých studií nekonzistentní [de Leval et al., 2003], avšak většina z těchto studií označila vysoký proliferční index jako negativní prognostický faktor [Miller et al., 1994, Slymen et al., 1990, Grogan et al., 1988]. V podobném duchu předpokládaná konstitutivní aktivace NFκB signální dráhy, jako negativní prognostický faktor, může náležet k pozitivním prediktivním faktorům při využití cílené inhibice této signální dráhy. Proto komplexní či komplexnější imunohistochemický profil DLBCL včetně detekce aktivace signální dráhy NFκB může být navržen k optimalizaci biologického hodnocení/dělení DLBCL a to nejen v rámci podskupin, ale i subtypů, podobně jako u detekce positivity Bcl-2 u GCB-like a nonGCB-like DLBCL NOS, která umožňuje odlišit biologicky a prognosticky nejpříznivější GCB-like DLBCL NOS Bcl-2 pozitivní a biologicky nejméně příznivé DLBCL NOS nonGCB-like Bcl-2 pozitivní v době R-CHOP protokolu [Coiffier, 2007]. Na přelomu tisíciletí, před zavedením terapeutického protokolu R-CHOP, byla pozitivita exprese Bcl2 u *de novo* DLBCL hodnocena jako nezávislý negativní prognostický faktor (kratší DFS i OS) i přes výrazně variabilní cut-off od 10% po min. 50% pozitivních neoplastických buněk [de Leval et al. 2003]. Nutno poznamenat, že se dosud neustálil jednoznačný konsensus cut-off pro Bcl-2 negativitu a pozitivitu [Sanchez et al. 1998, Gascoyne et al. 1997, Hermine et al. 1996, Hill et al. 1996, Kramer et al. 1996, Barrans et al. 2002, de Leval et al. 2003]. Zajímavým detekovaným biologickým fenoménem byl odlišný interval počtu pozitivních lymfatických uzlin u podskupin GCB-like, nonGCB-like a „třetí“ nezařaditelné podskupiny, který by mohl být chápán jako postupně se rozvíjející diseminující (kolonizující) lymfoproliferativní onemocnění u GCB-like DLBCL NOS (širší interval počtu pozitivních lymfatických uzlin a nižší medián počtu pozitivních lymfatických uzlin) s pravděpodobně nižším potenciálem pro agresivnější lokální biologické chování, které se (v tomto pořadí) nejspíše zvyšuje u podskupiny nonGCB-like a „třetí“ (užší interval počtu pozitivních lymfatických uzlin a vyšší medián počtu pozitivních lymfatických uzlin). Vyšší hladinu leukocytózy a trombocytózy u GCB-like podskupiny lze vysvětlovat mnoha různými způsoby, avšak ve spojitosti se současně detekovaným širším intervalem počtu pozitivních lymfatických uzlin je možné zcela hypoteticky předpokládat biologickou odpověď na cirkulující a kolonizující neoplastickou lymfoidní populaci (neoplastický „homing“). Nicméně je stále zapotřebí vnímat DLBCL jako vysoce heterogenní diagnostickou „jednotku“ tak, jak nám ukazují recentní publikované studie zahrnující klinický vývoj včetně odpovědi na terapii, morfoloický obraz, imunohistochemický a genetický profil a vliv mikroprostředí, tedy kontextuální biologický vývoj a jeho interakce s dostupnou terapeutickou intervencí. Základní známé znaky celé skupiny DLBCL dle WHO 2008 a jejich vysoká variabilita na úrovni morfoloické, imunohistochemické a genetické jsou souhrnně označeny v tab. 20.

Tab. 20 Typické morfologické, imunofenotypické a genetické znaky velkobuněčných B-lymfomů (Flodr et al., 2014)

<b>DLBCL</b>	Main histologic feature(s)	Immunoprofile	Genetic feature(s)
Centroblastic variant	More than 90% of centroblasts	Variable	Variable
Immunoblastic variant	More than 90% of immunoblasts	Variable	Variable
Anaplastic variant	Large and very large cells with distinct anaplasia, HRS-like cells	Variable, usually CD30 positive	Variable
Rare variants	Spindle-shaped, signet ring cells, etc.	Variable	Variable
GCB-like	Variable	Variable	GEP of GC B-cells
ABC-like	Variable	Variable	GEP of activated B-cells
CD5-positive	Variable	Usually de novo, only rarely arising from B-CLL/SLL, cyclin D1 negative	Variable
GCB-like	Variable	Immunophenotype acc. Hans' classifier	Doesn't correlate exactly with GEP
Non-GCB-like	Variable	Immunophenotype acc. Hans' classifier	Doesn't correlate exactly with GEP
<b>THRLBCL</b>	Scattered and single neoplastic B-cells, usually centroblasts and HRS-like cells, in a dominant „background“	Usually Bcl-6 positive, EMA and Bcl-2 variably positive	Variable
Primary of the CNS	Usually centroblasts characteristically in perivascular spaces	Usually express MUM1/IRF4 and Bcl-6, only minority CD10 positive	High load of ongoing somatic hypermutations, up to 40% with BCL-6 translocations
PCLBCL, leg type	Confluent sheets of centroblasts and immunoblasts	Strong expression of Bcl-2, MUM1/IRF4, usually Bcl-6 positive and CD10 negative	Amplification of the BCL-2 gene, translocation of c-MYC and BCL-6, GEP of ABC-like
EBV-positive of the elderly	Diffuse infiltration with effacement, large cells, centroblasts, HRS-like cells	MUM1/IRF4 usually positive, CD10 and Bcl-6 typically negative, variably CD30 positive, usually LMP1 positive	Variable
<b>PMLBCL</b>	Usually ass. with compartmentalizing alveolar fibrosis, medium to large cells with pale cytoplasm, HRS-like cells may be detected	CD30, CD23 and MUM1/IRF4 usually expressed, Bcl-6 and Bcl-2 variably expressed	High load of ongoing somatic hypermutations, GEP shares features with cHL, rearrangements of BCL-2, BCL-6 and c-MYC are rare
Intravascular	Intravascular localization of neoplastic B-cells in small and intermediate vessels including sinusoids	Expression of CD5 and CD10 may be detected	Few cases have been studied

Tab. 20 Typické morfologické, imunofenotypické a genetické znaky velkobuněčných B-lymfomů (Flodr et al., 2014) - pokračování

ass. with chronic inflammation	Usually centroblasts/immunoblasts	In cases with plasmacytic differentiation loss of pan B-cell positivity is detected with expression of CD138 and MUM1/IRF4, LMP1 positive, CD30 variably expressed	Complex karyotypes, overexpression of IFI27, downregulation of HLA class I expression
LyG	Angiocentric and angiodestructive polymorphous lymphoid infiltrate, EBV-positive cells with immunoblast and HRS-like morphology, Grading acc. proportion of EBV-positive cells	CD30 variably expressed, CD15 negative, LMP1 positive	Demonstration of clonal rearrangement of immunoglobulin genes is more consistent in grade 2 and 3
ALK-positive	Immunoblasts, plasmablasts, multinucleated giant cells	Usually granular cytoplasmic ALK1 positivity, EMA and CD138 expression, CD30 usually negative	The most frequent is t(2;17)(p23;q23) with CTLC-ALK fusion protein
Plasmablastic	Immunoblasts, plasmablasts	Commonly positive for CD138, MUM1/IRF4, EMA, CD30, weak positivity of CD20, PAX5, usually negative for CD56	Variable
arising in HHV8-ass. multicentric Castleman disease	Milieu MCD with neoplastic plasmablasts in mantle zones, scattered in interfollicular areas, in progression neoplastic cells form sheets	cIgM positive, lambda light chain restriction, LANA-1 positive	Microlymphomas may be mono or polyclonal, unambiguous PL is monoclonal, immunoglobulin genes are unmutated
Primary effusion lymphoma	Serous effusion without tumour masses, immunoblasts, plasmablasts, anaplastic cells, HRS-like cells	Lack pan B-cell markers positivity, usually positive for CD138, CD30, EMA	Immunoglobulin genes are clonally rearranged, T-cell receptor genes may be clonally rearranged
B-UCL with features intermediate between DLBCL and BL	Medium to large neoplastic cells, starry sky pattern, prominent mitotic and apoptotic activity	Usually CD10 and Bcl-6 positive, Bcl-2 and MUM1/IRF4 variably positive or negative	Up to 50% with c-MYC translocation, up to 15% with BCL-2 translocation, both detected in double hit lymphoma, BCL-6 translocation is less frequent
B-UCL with features intermediate between DLBCL and cHL	Confluent growth with pleomorphic cells that show variable cytologic appearance in a diffusely fibrotic stroma	Pan B-cell markers positive, PAX-5, CD30 and CD15 usually positive, Bcl-6 variably positive, CD10 negative	Specific genomic studies have not been performed

Zkratky: GCB – germinal centre B-cell, ABC – activated B-cell, GEP – gene expression profiling, THRLBCL – T-cell/histiocytic reach large B-cell lymphoma, PCLBCL – Primary cutaneous large B-cell lymphoma, PMLBCL – Primary mediastinal large B-cell lymphoma, HRS – Hodgkin/Reedberg-Sternberg cell, B-UCL - B-cell lymphoma unclassifiable, cHL – classical Hodgkin lymphoma, BL – Burkitt lymphoma, LyG – Lymphomatoid granulomatosis, HHV-8 – Human herpes virus-8

Následujícím krokem je další rozšiřování souboru DLBCL nejen v rámci NOS, ale i dalších podskupin DLBCL včetně doplňování příslušných klinických, laboratorních, morfologických a imunohistochemických dat. Nově aplikovanou metodou bude hmotnostní spektrometrie s komparativní proteinovou analýzou (mass spectrometry – MS, MS based comparative protein analysis) pro získání optimálnější proteinové studie (proteinového profilu) lymfomů [12, 27, 28], která může přinést a pravděpodobně i přinese bližší pohled nejen na biologii DLBCL, ale i vyšší stupeň diagnostické přesnosti určení lymfomů obecně „uniquely lymphoma associated expressions of protein clusters“ s překryvem/vztahem k známé morfologii a imunoprofilu [27, 28]. Navíc mohou být odhaleny nové prognostické popř. i prediktivní proteinové markery a faktory vzniku a progresu daného lymfoproliferativního onemocnění (lymfomageneze) [28]. Microarray mRNA expresní profil bohužel postrádá možnost určení lokalizace příslušného proteinu a také post- a ko-translační modifikace. Proteinový profil včetně modifikací v rámci celého (neoplastického) proteomu (konkrétní exprimované proteiny a jejich izoformy) může být zjištěn přímo hmotnostní spektrometrií MS [27, 28], a aby byl korektně označen kontextuální patogenetický význam potenciálních biomarkerů, musí být provedena co nejširší subtrakce nenádorového proteinového profilu (pozadí) zahrnující „naïve, resting, proliferating“ nenádorové B-lymfocyty. Deregulace exprese proteinů a jejich funkce (mislokace, trunkace, post- a ko-translační modifikace) jsou také úzce spjaty se stádiem/rozsahem a dalším biologickým vývojem lymfomu (dynamická lymfomageneze) a právě MS by mohla přinést bližší poznání a možnost sledování této dynamiky u konkrétního lymfoproliferativního onemocnění i v odpovědi na terapii [28].

Recentně popsané nové epigenetické seskupování (dělení) DLBCL vzhledem k DNA metylační variabilitě (neoplastický versus „fyziologický“ a interneoplastický metylom) je také zásadně přispívající k optimálnějšímu (reálnějšímu) biologickému dělení [19, 29] a je spojeno s charakteristickým ovlivněním specifické signální dráhy („cytokine-mediated, ephrin signaling, apoptosis, cell cycle regulation“) [29]. Obecná onkogeneze popisuje proces hypermetylace promotorů tumor supresorových genů, která přispívá k neoplastické transformaci [Oricchio et al., 2011, 26]. Globální DNA hypometylace (detekována jako globální ztráta 5-methylcytosinu vzorku DNA DLBCL) vede ke genomové nestabilitě [Herman et al., 2003] a rozsah DNA metylačních změn („high and low risk group“ vzhledem k vyššímu a nižšímu stupni metylačních změn) predikuje přežívání pacientů s dg. DLBCL [19, 29].

Souhrnně lze říci, že vědní disciplíny známé jako „omics“ (genomics, transcriptomics, epigenomics, methylomics, proteomics, proteogenomics, metabolomics, metabonomics, interactomics etc.) a související biologický podklad hrají zásadní úlohu v poznání komplexního vývoje lymfoproliferativních onemocnění včetně nedílné součásti odpovědi na aplikovanou léčbu. Neustále se rozšiřující

biologické poznatky a databáze obohacující naše recentní souhrnné vědomosti o lymfoproliferativních onemocněních mohou být užity v přesnější a cílenější tzv. „tailored diagnostics“ a potažmo stále více žádanější „tailored therapy“, tedy diagnostice a terapii šité (či „přešíváné“) na míru daného onemocnění.

Vzhledem k rozsahu, multidisciplinaritě a dynamickému rozvoji biologického poznání lymfoproliferativních onemocnění bylo vytvořeno několik projektů (po dobu trvání řešení této práce) se žádostí o grantovou podporu (IGA NS9946-4, IGA NT11090, IGA NT13583, IGA NT14298, IGA NT14412, IGA NT11103, IGA NT14393, CZ.1.07/2.2.00/07.0294), z nichž IGA NT11103, IGA NT14393, MSM 6198959205, CZ.1.07/2.2.00/07.0294 byly financovány a řešeny, a u projektu IGA NT14393 v současné době probíhá řešení.

## **6. Nové vize, horizonty a konsekvence v potenciální terapii**

### **6.1. Idiotypická vakcinace v léčbě B-lymfomů**

B-NHL lymfomy vykazují známky imunogenicity, která může být užita v nové imunoterapeutické strategii s anti-nádorovými vakcínami vzhledem k nádorově specifické imunitní odpovědi a dokonce i dosažení remise na molekulární úrovni současně popsané u folikulárního lymfomu (Muraro et al., 2013). Nicméně vývoj „anti-lymfomových“ vakcín (individualizované idiotypické vakcíny) je stále vysoce časově a finančně náročný komplexní proces, přesto se z prvních studií zdá být jedním z „(nej)fyziologičtějších“ přístupů k onkologické terapii s minimem nežádoucích účinků.

## **7. Souhrn**

Komplexní hematopatologické vyšetření hraje pro stanovení diagnózy, prognózy a stagingu lymfoproliferativního onemocnění jednu z nezastupitelných rolí. Od počátku vzniku prvních klasifikací maligních hematologických onemocnění se postupně morfologický a klinický náhled sdružuje v kontextuální biologický obraz s použitím metod molekulární patologie. Nový kritický pohled umožňuje optimalizaci stanovení jak diagnózy, tak i prognózy a popř. predikci konkrétního lymfoproliferativního onemocnění. Tento přístup využívá recentní stratifikovaná klasifikace lymfoproliferativních onemocnění [WHO 2008]. Cílem projektu bylo stanovit a zhodnotit imunoprofil vyšetřovaných lymfoproliferativních onemocnění, konkrétně *de novo* DLBCL NOS. Současně byl vytvořen a je dále rozšiřován soubor T-lymfoproliferativních onemocnění a mnohočetného myelomu. V retrospektivně a prospektivně získaném souboru *de novo* DLBCL NOS byla stanovena imunohistochemická exprese proteinů CD10, Bcl-6, Bcl-2, MUM1/IRF4, CD30, proteinů rodiny NFκB (p50, p52, p65) a proliferační aktivity při stanovení indexu Ki67. Statisticky byl zhodnocen vztah mezi imunohistochemickou expresí vyšetřovaných proteinů a délkou bezpříznakového období/období bez

progrese, délkou období celkového přežití, sledovanými morfologickými, laboratorními parametry (základní morfologie, PKO, LDH,  $\beta$ 2mikroglobulin, sTK, IL-2, rIL-2, CA125, infiltrace KD, cytogenetické změny – konvenční cytogenetika s detekcí simplexní/komplexní genotyp), radiologickými (zobrazovacími) parametry (počet pozitivních LU, velikost LU), klinickými parametry (základní klinické údaje včetně chemoterapeutického protokolu, staging onemocnění dle Ann Arbor, klinický průběh, B-symptomy, indexy IPI, aa-IPI, PS). Po kompletním zpracování (dle dostupnosti reprezentativního materiálu, klinických, laboratorních, zobrazovacích a molekulárně biologických metod) byl získán soubor 59 pacientů s 27 muži (45,76%) a 32 ženami (54,24%) s diagnózou *de novo* DLBCL NOS s medián věku 64 (26-84) let. Počet postižených lymfatických uzlin dosahoval maxima 16 s mediánem 2 lymfatické uzliny. Ve vyšetřovaném imunohistochemickém profilu dle výše uvedené IHC metodiky a byly sledovány znaky CD10 (pozitivní nad 30%), Bcl-6 (pozitivní nad 30%), MUM1/IRF4 (pozitivní nad 30%), Bcl-2 (pozitivní nad 5%, 10% a 30%), Ki67 - zde pozitivita uváděna v procentech, min. 40% pozitivita Ki67 byla diskriminační pro diagnózu DLBCL, sledována byla hladina Ki67 pod 70%, nad 70% včetně do 90% a nad 90% včetně. Hladina („cut off point“) positivity u experimentálního sledování exprese proteinů p50, p52, p65 nebyla stanovena, uvádí se v detekovaném % pozitivních buněk. Jadernou pozitivitu p50 vykazovalo 17 případů (28,81%), pozitivitu p65 pouze jeden případ (1,69%) a nebyla zaznamenána jaderná pozitivita p52. Výsledky všech imunohistochemicky sledovaných znaků viz tab 7. Dle Hans classifier (Hans et al., 2004) bylo selektováno 31 GCB-like DLBCL a 17 nonGCB-like DLBCL, v 11 případech (18,65%) nebylo možné jednoznačně zařazení ani do jedné ze skupin (viz tab. 8). Nejpočetnější stádium dle Ann Arbor stážívacího systému bylo stádium IV (40,68%, viz tab. 4). Sledovaná morfologie neoplastické populace (centroblastická, imunoblastická, anaplastická) byla korelována k proliferační aktivitě a znaku CD30 bez zjištění statisticky významné signifikance. Znaky Bcl-2, Bcl-6, CD10, MUM1/IRF4, CD30, Ki67, p50, p65 a rozdělení na skupiny GCB-like a nonGCB-like byly vztaženy k celkovému přežití (OS) a doby do progrese onemocnění (PFS). Statisticky signifikantní byl rozdíl doby do progrese a v počtu relabujících/progredujících případů s CD10 pozitivní a negativní expresí (viz graf 2 a tab. 9,  $p < 0,04$ , resp.  $p < 0,025$ ). Statisticky signifikantní byl rozdíl doby do progrese a v počtu relabujících/progredujících případů u GCB-like a nonGCB-like/„třetí“ podskupiny DLBCL NOS (viz graf 4 a tab. 10,  $p < 0,035$ , resp.  $p < 0,04$ ). U všech relabujících případů ( $n=11$ ) byla zjištěna negativita CD10 a 28 případů bez relapsu vykazovalo pozitivitu CD10. Většina GCB-like případů ( $n=26$ ) byla bez známek progrese onemocnění, pouze 11 případů nonGCB-like nevykazovalo progresi a zároveň i progrese u této podskupiny byla čtenější ( $n=5$  u nonGCB-like versus  $n=2$  u GCB-like). Nezařaditelné případy do GCB a nonGCB-like podskupiny („třetí“ skupina, 18,65%) měly velmi podobnou křivku PFS jako podskupina nonGCB-like a statisticky nesignifikantně horší křivku OS (viz graf 4). Lepší odpověď na chemoterapii (CR) blíží se statistické signifikanci ( $p < 0,07$ ) vykazovaly případy Bcl-2 pozitivní s pozitivitou nad 30% včetně ( $n=30$ ) a pouze v osmi případech byla zjištěna PR



a ve čtyřech případech PD (tab. 11). U identické hladiny positivity Bcl-2 (nad 30%) byly detekovány statisticky nesignifikantně vyšší intervaly OS a PFS (graf 1), tedy delší interval celkového přežití a doby do progresu ( $p < 0,19$ , resp.  $p < 0,11$ ). Vyšší leukocytóza byla statisticky nesignifikantně spojena s pozitivitou Bcl-6 (tab. 12, graf 6) a s expresí p50 (tab. 13, graf 7). Vyšší hladina lymfocytózy vykazovala statisticky signifikantní korelaci s pozitivitou CD10 (tab. 14, graf 8,  $p < 0,045$ ) a statisticky nesignifikantní korelaci s negativitou CD30 (tab. 15, graf 9,  $p < 0,08$ ). Vyšší hladiny IL-2 byly detekovány u případů s proliferační aktivitou Ki67 vyšší než 90% (graf 12,  $p < 0,075$ ). Statisticky nesignifikantní byla vyšší hladina LDH u případů p50 negativních (tab. 18,  $p < 0,08$ ). Statisticky nesignifikantní lepší OS a PFS vykazovaly případy s vyšší úrovní proliferační aktivity dle indexu Ki67 (s pozitivou více než 70%) v porovnání s detekovanou nižší proliferační aktivitou dle indexu Ki67 (s pozitivou pod 70%) (graf 3,  $p < 0,4$ , resp.  $p < 0,82$ ). Statisticky nesignifikantní vztah vykazovala exprese p50 a zjištěný OS/PFS (graf 5,  $p < 0,60$ , resp.  $p < 0,73$ ). Statisticky signifikantně vyšší hladina s-TK byla detekována u případů DLBCL NOS s pozitivitou Bcl-2 vyšší než 5% (tab. 16, graf 10,  $p < 0,03$ ). Negativní exprese MUM1/IRF4 vykazovala statisticky signifikantní vyšší hladinu  $\beta 2$ mikroglobulinu (tab. 17, graf 11,  $p < 0,003$ ). Interval minima a maxima počtu pozitivních lymfatických uzlin vykazoval největší rozptyl u GCB-like podskupiny a zúžování v porovnání mezi podskupinami (v tomto pořadí) DLBCL NOS GCB-like, nonGCB-like a „třetí“ podskupinou s tím, že medián počtu pozitivních lymfatických uzlin byl nejnižší u GCB-like podskupiny a nejvyšší u nonGCB-like (graf 15,  $p < 0,09$ ). Nicméně statisticky signifikantní rozdíl v počtu pozitivních lymfatických uzlin byl detekován pouze mezi skupinou GCB- a nonGCB-like DLBCL NOS (tab. 19, graf 13,  $p < 0,045$ ). Statisticky nesignifikantně vyšší hladina trombocytózy a vyšší hladina leukocytózy blížící se statistické signifikanci byla detekována u podskupiny GCB-like (graf 14, 16,  $p < 0,08$ , resp.  $p < 0,055$ ) a současně byl zjištěn i nejvyšší rozptyl intervalu úrovně trombocytózy a leukocytózy u téže podskupiny vzhledem k nonGCB-like ( $p < 0,055$ ) a „třetí“ ( $p = 0,05$ ) podskupině DLBCL NOS. Využitá byla i metoda tkáňové mikroarray (TMA), avšak vzhledem k nezískání optimálního počtu a objemu reprezentativní tkáně s přítomností DLBCL NOS nebyla dosažena úroveň pro korektní statistické zhodnocení.

V krátkosti lze říci, že DLBCL (a také lymfoproliferativní onemocnění obecně) vykazují rozsáhlou a stále se rozšiřující heterogenitu v rovině klinické, morfoloické a molekulárně biologické ať už v běžné diagnostice, tak v experimentu a jedině úzká spolupráce celého hematologického týmu (renomovaný kliník, hematopatolog, molekulární biolog a statistik) se stává skutečným benefitem pro stanovení korektní diagnózy s jednoznačným dopadem na (stále více) cílenou a na míru šitou („tailored“) terapií příslušného lymfoproliferativního onemocnění. Je také nedílnou součástí nových vhladů do biologie lymfoidních buněk, ať už nádorových nebo nenádorových, a designů hypotetických testovaných experimentálních algoritmů a zjištěných nových užitečných algoritmů v translačním lékařství, které se

promítají v reálnějším biologickém hodnocení a terapeutické intervenci (sledované prognostické a prediktivní faktory) každého jednotlivého lymfoproliferativního (a obecně i onkologického) onemocnění daného jedince, tedy reálného jednotlivého pacienta.

## 8. Použité zkratky

$\alpha 4$  – Integrin alfa

$\alpha 4\beta 1$  – Integrin alfa 4 beta 1

$\alpha 4\beta 7$  – Integrin alfa 4 beta 7

$\alpha 5\beta 1$  – Integrin alfa 5 beta 1

$\alpha E\beta 7$  – Integrin alfa E beta 7

A1/Bfl1 – BCL-2-related protein A1 (Bcl2a1 /Bfl1/A1)

aa-IPI – Age adjusted International prognostic index

Ab's – Antibodies

ABC – Avidin-biotin

ABC-like – Activated B-cell like

ALCL – Anaplastic large cell lymphoma

ALCL – Anaplastic large cell lymphoma

ALK – Anaplastic large cell lymphoma kinase

ALL – Acute lymphoblastic lymphoma/leukemia

AMK – aminokyselina

$\beta 1$  integrin – Beta1 integrin

$\beta 2$  mikroglobulin – Beta 2 mikroglobulin

$\beta 3$  integrin – Beta3 integrin

BAD – Bcl-2-associated death promoter

BAFFR – B-cell activating factor receptor

BAK – Bcl-2-antagonist/killer

BCL-2 – B-cell CLL/lymphoma 2

BCL-3 – B-cell CLL/lymphoma 3

BCL-6 – B-cell CLL/lymphoma 6

B-CLL/SLL – B-chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma

BCLXL – B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl, BCL2L1 – Bcl-2-like protein 1)

Bim – Bcl-2 interacting mediator of cell death

BIOMED-2 – The EuroClonality consortium

BL – Burkitt lymphoma

B-NHL – B-cell non-Hodgkin lymphoma

bp – base pair(s)

B-UCL – B-cell lymphoma unclassifiable

CA125 – Cancer antigen 125

CALLA – Common acute lymphoblastic leukemia antigen

CAM-DR – Cell adhesion mediated drug resistance

CCL17 – Chemokine ligand 17

CCL19 – Chemokine ligand 19

CCL21 – Chemokine ligand 21

CCL25 – Chemokine ligand 25

CCL27 – Chemokine ligand 27

CCL28 – Chemokine ligand 28

CCL3 – Chemokine ligand 3

CCR10 – Chemokine receptor 10

CCR3 – Chemokine receptor 3

CCR4 – Chemokine receptor 4

CCR6 – Chemokine receptor 6

CCR7 – Chemokine receptor 7

CCR9 – Chemokine receptor 9

CD – Cluster of differentiation (cluster of designation, classification determinant)

CD10 – Cluster of differentiation 10

CD1a – Cluster of differentiation 1a

CD20 – Cluster of differentiation 20

CD23 – Cluster of differentiation 23

CD30 – Cluster of differentiation 30

CD45R0+ – Cluster of differentiation 45R0+

CD5 – Cluster of differentiation 5

CD79a – Cluster of differentiation 79a

CD99 – Cluster of differentiation 99

Cdc42 – Small GTPase

cHL – Classical Hodgkin lymphoma

c-IAP1 – Cellular inhibitor of apoptosis protein-1

c-IAP2 – Cellular inhibitor of apoptosis protein-2

CLA – Cutaneous lymphocyte antigen

c-Maf – Proto-oncogen, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene

c-Myc – Proto-oncogen, myelocytomatosis oncogene

CR – complete remission

CTCL – Cutaneous T-cell lymphoma

CXCL10 – C-X-C motif chemokine ligand 10

CXCL12 – C-X-C motif chemokine ligand 12

CXCL13 – C-X-C motif chemokine ligand 13

CXCR3 – C-X-C motif chemokine receptor 3

CXCR4 – C-X-C motif chemokine receptor 4

CXCR5 – C-X-C motif chemokine receptor 5

CXCR6 – C-X-C motif chemokine receptor 6

Cyclin D2 – G1/S-Specific Cyclin D2

D gene – Genes between the V and J genes, coding D region of heavy-chain Ig or beta/delta-chain of the T-cell receptor

DC's – Dendritic cells

DLBCL – Diffuse large B-cell lymphoma

DNA – Deoxyribonucleic acid

E-boxes – Enhancer Box sequences

EBV – Epstein-Barr virus

ECM – Extracellular matrix

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

EMT – Epithelial mesenchymal transition

E-selectin – CD62 antigen-like family member E (endothelial-leukocyte adhesion molecule 1, endothelial-leukocyte adhesion molecule 2)

EuroClonality/BIOMED-2 – EuroClonality consortium

F – Femininum

FDA – Food and Drug Administration

FFPE – Formaline-fixed, paraffin-embedded

FL – Follicular lymphoma

G0 – Cell cyclus phase G0

G1 – Cell cyclus phase G1

GADD45h – Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 protein

GALTs – Gut-associated lymphoid tissues

GC – Germinal center

GCB – Germinal center B-cell

GCB-like – Germinal centre B-cell like

GEP – Gene expression profile

GIT – Gastrointestinal tract

G-protein – Guanosine nucleotide-binding proteins

HAT's – Histone acetyltransferases

HDAC - Histone deacetylase

HEV – High endothelial venules

HEV-like vessels – High endothelial like vessels

HGF – Hepatocyte growth factor (hepapoietin A, scatter factor)

HHV8 – Human herpes virus 8

HRS – Hodgkin/Reedberg-Sternberg cell

CHOP – Chemoterapy regimen - Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin (vincristine), Prednisone/Prednisolone

CHT – Chemotherapy

IAP – Inhibitor of apoptosis

IgD – Immunoglobulin heavy-chain D

IGH FR1 – Immunoglobulin heavy-chain framework 1

IGH FR2 – Immunoglobulin heavy-chain framework 2

IGH FR3 – Immunoglobulin heavy-chain framework 3

IGK – Immunoglobulin kappa light chain gene

IGK Kde – Immunoglobulin kappa-deleting element

IGK V-J – The variable and the joining regions of immunoglobulin kappa light-chain locus

IgM – Immunoglobulin heavy-chain M

IgVH – Immunoglobulin variable region heavy-chain gene

IHC – Immunohistochemistry

IKK – Inhibitor kappa B kinase

IL-2 – Interleukine 2

IL-4 – Interleukin 4

IL-6 – Interleukine 6

ILSG – International Lymphoma Study Group

IPI – International prognostic index

IRES – Internal ribosome entry system

ITLs – Intestinal T-cell lymphomas

IκB – Inhibitor kappa B

IκBα – Inhibitor kappa B alfa

I $\kappa$ B $\beta$  – Inhibitor kappa B beta

I $\kappa$ B $\delta$  – Inhibitor kappa B delta

I $\kappa$ B $\gamma$  – Inhibitor kappa B gamma

J gen – Genes coding J region of heavy-chain Ig or beta/delta-chain of the T-cell receptor

JAM – Junctional adhesion molecule

KD – Kostní dřeň

lateGC – Late germinal center

LBCL – Large B-cell lymphoma

LDH – Lactate dehydrogenase

LFA-1 -  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 – Integrin

LFA-1 -  $\alpha$ L $\beta$ 2 – Integrin

LFA-1 - $\alpha$ 4 $\beta$ 7 – Integrin

L-Myc – Proto-oncogen L-myc, lung carcinoma myc related oncogen

Lt $\beta$ R – Lymphotoxin-beta receptor

LU – Lymfatická uzlina

LyG – Lymphomatoid granulomatosis

M – Masculinum

M – Mitotic phase of the cell cyclus

MAdCAM-1 – Addressin, mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1

MALT – Mucosa associated lymphoid tissue

Max – Maximum

MF – Mycosis fungoides

Min - Minimum

miR-17-5p – micro RNA 17-5p

miR-20a – microRNA 20a

miRNA-17-92 – cluster microRNA 17-92

Miz-1 – Myc-interacting zing finger protein 1

MLN02 – Humanized antibody to integrin  $\alpha 4\beta 7$

MLP – Malignant lymphoid polyposis

MM – Multiple myeloma

MME – Membrane metalloendopeptidase

MMP – Matrix metalloproteinase

mRNA – messenger RNA

MS – Mass spectrometry/MS based comparative protein analysis

MS4A1 – Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 1

MUM1/IRF4 – Multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatory factor 4

Myc – Myelocytomatosis viral oncogene

Myc-nick – Cytoplasmic variant of c-Myc (transcriptionally inactive cleavage product)

MZL – Marginal zone lymphoma

N – Nitrogen

N (No.) – Number

NEP – Neutral endopeptidase

NES – Nuclear exporting sequences

NFkappaB – Nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells

NK – Natural killer

NLPHL – Nodular lymphocytic predominance Hodgkin lymphoma

NLS – Nuclear localisation sequences

n-Myc – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

nonGCB – Nongermlinal center B-cell

nonGCB – Non-germlinal centre B-cell like

NOS – Not otherwise specified

„omics” – Genomics, transcriptomics, epigenomics, methylomics, proteomics, proteogenomics, metabolomics, metabonomics, interactomics etc.

OS – Overall survival

p – Krátké raménko chromozomu



p21 – Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CIP1, WAF1)

PACEBO – Chemotherapy regimen, Cyclophosphamide, Adriamycin, Etoposide, Bleomycin, Prednison/Prednisolon

PAX5 – Paired box 5 (Family of transcription factors, B-cell lineage specific activator protein - BSAP)

PCLBCL – Primary cutaneous large B-cell lymphoma

PCR – Polymerase chain reaction

PD – progressive disease

PECAM-1 (CD31) – Platelet endothelial cell adhesion molecule-1

PFS – Progression free survival

pH – potential of hydrogen (pondus hydrogenia)

PI3K – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PKO – Periferní krevní obraz

PLN – Peripheral lymph node

PMLBCL – Primary mediastinal large B-cell lymphoma

PNAAd – Peripheral lymph node addressin

PR – Partial remission

preGC – Pre germinal centre

PS – Performance status

PTCLU – Peripheral T-cell lymphoma unspecified

q – Dlouhé raménko chromozomu

Rac – small GTPase

REAL – Revised European American Lymphoma

RelA – Avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (p65, NFkappaB3)

RelB – Avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B

RHD – Rel homologous domain

RhoA – small GTPase

R-CHOP

rIL-2 – Interleukine 2 receptor

RNA – Ribonucleic acid

rRNA – ribosomal RNA

SALT – Skin associated lymphoid tissue

SD – Standard deviation (contextual)

SD – Stable disease (contextual)

SS – Sézary syndrome

Stage – Stádium

Staging onemocnění – Stádium onemocnění

STAT – Signal transducers and activators of transcription pathway

sTK – Serum thymidine kinase

TCR – T-cell receptor

TCRA – T-cell receptor alpha

TCRB – T-cell receptor beta

TCRG – T-cell receptor gamma

TCRD – T-cell receptor delta

TCR $\gamma\delta$  – T-cell receptor gamma delta

TdT – Terminal deoxynucleotidyl transferase

THRLBCL – T-cell/histiocytic reagent large B-cell lymphoma

TMA – Tissue microarray

TNF – Tumor necrosis factor

TNFR – Tumor necrosis factor receptor

TNFRSF8 – Tumor necrosis factor receptor superfamily 8

Toll/IL-1R – Toll/interleukin 1 receptor (TIR)

TRAF1-3 – TNF receptor associated factor 1-3

TRAF5 – TNF receptor associated factor 5

Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethane

uPA/uPAR – Urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor

USA – United States of America

3'UTR – The three prime untranslated region (trailer sequence)

5'UTR – The five prime untranslated region (leader sequence)

V gene – Genes coding V region of heavy-chain Ig or beta/delta-chain of the T-cell receptor

VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule 1

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VH – Variable heavy-chain gene region

VHDHJH – In frame (productive/non-productive) joints

VL – Variable light chain-gene region

W – Watt

WHO – World Health Organisation

WNTs – Wnt signaling pathways (Wingless and Integrase-1)

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis

## 9. Původní vědecké publikace, přehledové články, publikovaná abstrakta, postery (IF uveden)

### 9.1. Původní vědecké publikace

1. Mohamed G, Vrzalikova K, Cader Z, Vockerodt M, Nagy E, **Flodr P**, Yap LF, Diepstra A, Kluin P, Rosati S, Murray P. Epstein-Barr Virus, The Germinal Centre and The Development of Hodgkin's Lymphoma. J Gen Virol. 2014 Jun 3. [Epub ahead of print] **(IF 3,127)**
2. Jarošová M, Kučerová J, **Flodr P**, Mikešová M, Procházka V, Papajík T. Use of archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples for molecular genetic analysis in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Cesk Patol. 2014 April;50(2):95-99.
3. Papajík T, Mysliveček M, Urbanová R, Buriánková E, Kapitáňová Z, Procházka V, Turcsányi P, Formánek R, Henzlová L, **Flodr P**, Jarošová M, Indrác K. 2-[18F]-FDG PET/CT examination in patients with chronic lymphocytic leukemia may reveal Richter's transformation. Leuk Lymphoma. 2013 June 14. [Epub ahead of print], 2014 Feb;55(2):314-9 **(IF 2,580)**
4. Papajík T, Mysliveček M, Skopalová M, Malan M, Buriánková E, Koza V, Hnatková M, Trněný M, Šedová Z, Kubová Z, Koranda P, **Flodr P**, Jarkovský J, Dusek L, Indrác K. Determining the

- extent and stage of disease in patients with newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma using 18F-FDG-PET/CT. *Neoplasma*. 2011;58(4):291-7 **(IF 1,190)**
5. Papajík T, Mysliveček M, Šedová Z, Buriánková E, Procházka V, Koranda P, Kubová Z, Palová M, Kučerová L, **Flodr P**, Jarkovský J, Dusek L, Indrák K. Standardised uptake value of 18F-FDG on staging PET/CT in newly diagnosed patients with different subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 2011 Jan;86(1):32-7 **(IF 1,478)**
  6. **Patrik Flodr**, Pavla Látalová, Martin Tichý, Zuzana Kubová, Tomáš Papajík, Michaela Šváchová, Lenka Radová, Marie Jarošová. Clinicopathological correlations of the immunoprofile in diffuse large B-cell lymphoma NOS - a single institution experience. *Cesk Patol*. 2015, č. rukopisu 212-2015
  7. Peter Rohon, Radka Nedomova, Ivana Prekopova, Jaromir Hubacek, Milena Holzerova, Zuzana Pikalova, **Patrik Flodr**, Tomas Papajik, Karel Indrak, Marie Jarosova. Acute myeloid leukemia with minimal differentiation: Unusual cytogenetics, morphology, phenotype and clinical course. *Leuk Res*. 2012 Jul;36(7):e133-6. Epub 2012 Apr 5. **(IF 2,923)**
  8. Sotkowski T, Sotkowska R, Pikalova Z, Tichy T, **Flodr P**, Tichy M, Houserkova D, Benysek V, Zlamalova N, Ruzicka V, Indrak K. Spontaneous splenic rupture in two patients with hematologic malignancy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2007 Jun;151(1):113-6.
  9. Vrzalikova K, Leonard S, Fan Y, Bell A, Vockerodt M, **Flodr P**, Wright KL, Rowe M, Tao Q, Murray PG. Hypomethylation and Over-Expression of the Beta isoform of BLIMP1 is Induced by Epstein-Barr Virus Infection of B cells; Potential Implications for the Pathogenesis of EBV-Associated Lymphomas. *Pathogens*. 2012;1(2):83-101. **(IF – 2012 Evaluation Pending)**

## 9.2. Přehledové články

1. Flodr P, Látalová P, Tichý M, Kubová Z, Papajík T, Šváchová M, Vrzalíková K, Radová L, Jarošová M, Murray PG. Diffuse Large B-cell Lymphoma – The History, Current View and New Perspectives. *Neoplasma* 61, 5, 2014. doi:10.4149/neo\_2014\_062. **(IF 1,574)**

## 9.3. Publikovaná abstrakta

1. **Flodr P**, Tichý M., Kubová Z., Papajík T., Krejčí V., Friedman E.: Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma - the role of NfkappaB. EJC Supplements 2008;6(9): 113-114. (abstract IF 4,454).
2. **Flodr P**, Kubová Z., Papajík T., Tichý M., Sedláková E., Krejčí V.: The Role of NfkappaB Signaling Pathway - Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma. Histopathol 2010. Oct;57(Suppl 1): 146-147. (abstract IF 3,569).
3. **P. Flodr**, P. Latalova, M. Tichy, Z. Kubova, T. Papajik, M. Svachova, L. Radova, M. Jarosova. Potential prognostic and predictive factors in diffuse large B-cell lymphoma. ESP ABSTRACTS 2014, PS-14-047. Virchows Arch (2014) 465 (Suppl 1):S1–S379. (**abstract IF 2,560**)
4. Minarik J, **Flodr P**, Pika T, Bacovsky J, Latalova P, Pusciznova P, Scudla V. Assessment of Signalling Pathways in Myeloma Bone Disease Using Selected Parameters of Bone Marow Microenvironment. December 6, 2014; Blood: 124 (21). (**abstract IF 9.775**)

#### 9.4. Postery

1. **Flodr P**, Tichý M, Tichá V, Kučerová L, Geierová M, Jezdinská V, Šváchová M. Particular T-lymphomas from the Register of Department of Pathology in the Range of 6-years period. 2007 2nd Central European Meeting, Technology Transfer Diagnostic Pathology, Haematopathology - Lymphomas, Pecs, Hungary, June 21-23 (poster).
2. **Flodr P.**, Tichý M., Kubová Z., Papajík T., Krejčí V., Friedman E.: Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma - the role of NfkappaB. Poster No. 435 with published abstract. EJC Supplements 2008;6(9): 113-114. (abstract IF 4,454).
3. **Flodr P**, Kubová Z., Papajík T., Tichý M., Sedláková E., Krejčí V.: The Role of NfkappaB Signaling Pathway - Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma. Poster No. 411 with published abstract. Histopathol 2010. Oct;57(Suppl 1): 146-147. (abstract IF 3,569).
4. **Flodr P**, Kubová Z., Papajík T., Tichý M., Sedláková E., Krejčí V.: The Role of NfkappaB Signaling Pathway - Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma. XXV. OHD 2011 (poster).
5. **Flodr P**, Látalová P, Tichý M, Jarošová M. The Cell Cycle Deregulation and Mantle Cell Lymphoma. XXVII. OHD 2013 (e-poster No. 26).
6. **Flodr P**, Látalová P, Tichý M, Kubová Z, Papajík T, Šváchová M, Radová L, Jarošová M. Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma. XXVIII. OHD 2014 (e-poster No. 33).

7. **P. Flodr**, P. Latalova, M. Tichy, Z. Kubova, T. Papajik, M. Svachova, L. Radova, M. Jarosova. Potential prognostic and predictive factors in diffuse large B-cell lymphoma. ESP ABSTRACTS 2014, PS-14-047, 26th ESP 2014, London, UK
8. Minarik J, **Flodr P**, Pika T, Bacovsky J, Latalova P, Pusciznova P, Scudla V. Assessment of Signalling Pathways in Myeloma Bone Disease Using Selected Parameters of Bone Marrow Microenvironment. ASH 2014, USA
9. **Flodr P.**, Látalová P., Tichý M., Kubová Z., Papajík T., Šváchová M., Radová L. Jarošová M. Clinicopathological Correlations of Immunoprofile in Diffuse Large B-cell Lymphoma. 21st Congress of Czech and Slovak Pathologist 2015, Prague, Czech Republic
10. **Flodr P.**, Minařík J., Pusciznova P., Látalová P., Pika T., Bačovský J., Ščudla V. Multiple myeloma and bone marrow microenvironment – immunohistochemical study. P12/2767, OHD 2015, Olomouc, Czech Republic

## 10. Poděkování

Poděkování patří mému excelentnímu mentorovi v oboru hematopatologie doc. MUDr. M. Tichému, CSc., mému výjimečnému mentorovi v biologii EBV-associovaných lymfoproliferací prof. P.G. Murray, Ph.D., nedílně též mé zásadní mentorce v biologii lymfoproliferativních onemocnění prof. RNDr. M. Jarošové, CSc. Za finanční podporu patří poděkování grantu IGA NT11103, IGA NT14393, MSM 6198959205, CZ.1.07/2.2.00/07.0294 a Leukemia and Lymphoma Fund, UK.

## 11. Reference:

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. Pathology and Genetics of Tumours Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Rodriguez-Abreu D, Filho BV, Zucca E. Peripheral T-cell lymphomas, unspecified (or not otherwise specified): a review. Hematol Oncol 2008;26:8-20.
3. Lynam-Lennon N, Maher GS, Reynolds VJ. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. Biol. Rev. 2009,84:55-71.
4. Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J. MicroRNA and cancer: Current status and prospective. Int J Cancer. 2006;120:953-960.

5. Wang V, Wu W. MicroRNA-based therapeutics for cancer. *Biodrugs*. 2009;23(1):15-23.
6. Sassen S, Miska AE, Caldas C. MicroRNA-implications for cancer. *Virchows Arch*. 2008;452:1-10.
7. Karin M, Lin A, NFkB at the crossroads of life and death, *Nat Immunol*, 2002;3:221-227.
8. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW, NFkB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2002;2:301-310.
9. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:225 - 60.
10. Gugasyan R, Grumont R, Grossmann M, et al. Rel/NF-kB transcription factors: key mediators of B-cell activation. *Immunol Rev* 2000;176:134 - 40.
11. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kB activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621 -63.
12. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kB is the answer --role of Rel/NF-kB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:8961 - 82.
13. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF-kB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:5923 - 9.
14. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680 - 3.
15. Jin R, De Smaele E, Zazzeroni F, et al. Regulation of the gadd45h promoter by NF-kB. *DNA Cell Biol* 2002;21:491 -503.
16. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of gadd45h by NF-kB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 2001;414: 308 - 13.

17. Grumont RJ, Rourke IJ, Gerondakis S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:400 - 11.
18. Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, et al. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and lymphoblastic lymphomas and defines survival related genes. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):4971 - 4982.
19. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828-33.
20. Flodr P, Tichý M, Tichá V, Kučerová L, Geierová M, Jezdinská V, Šváchová M. Particular T-lymphomas from the Register of Department of Pathology in the Range of 6-years period. 2007 2nd Central European Meeting, Technology Transfer Diagnostic Pathology, Haematopathology - Lymphomas, Pecs, Hungary, June 21-23 (poster).
21. Flodr P, Tichý M., Kubová Z., Papajík T., Krejčí V., Friedman E.: Potential Prognostic and Predictive Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma - the role of NFkappaB, *EJC supplements* 2008; 6(9): 113-114. (abstract IF 4,454).
22. Pals ST, de Gorter DJJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood*. 2007;110:3102-3111.
23. Katzenberger T, Ott G., Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic Alterations Affecting BCL6 Are Predominantly Found in Follicular Lymphomas Grade 3B with a Diffuse Large B-Cell Component. *American Journal of Pathology* 2004;165:481 -500.
24. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Chen W, LaCasce AS, Cattoretti G, Kurtin P, Pinkus GS, de Leval L, Harris NL, Savage KJ, Neuberg D, Habermann TM, Dalla-Favera R, Golub TR, Aster JC, Shipp MA. NFκB activity, function and target-genesignatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2005;106:1392-1399.
25. Gatter K, Pezzella F. Diffuse large B-cell lymphoma. *Diagnostic Histopathology*. 2009;16(2):69-81.



26. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, Brazier RM, Geng H, Iqbal J, Lenz G, Vose JM, Hans CP, Fu K, Smith LM, Li M, Liu Z, Gascoyne RD, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Jaye DL, Staudt LM, Chan WC. A New Immunostain Algorithm Classifies Diffuse Large B-cell Lymphoma into Molecular Subtypes with High Accuracy. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5494-5502.
27. Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. Immunohistologic and Functional Characterization of a Vascular Addressin Involved in Lymphocyte Homing into Peripheral Lymph Nodes. *The Journal of Cell Biology.* 1988;107:1853-1862.
28. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LWMM. Control of Lymphocyte Recirculation in Man. *The Journal of Immunology.* 1993;150(3):1105-1121.
29. Stamper HB, Woodruff JJ. Lymphocyte Homing into Lymph Nodes: In Vitro Demonstration of The Selective Affinity of Recirculating Lymphocytes for High-Endothelial Venues. *The Journal of Experimental Medicine.* 1976;144:828-833.
30. Donate C, Ody C, McKee T, Ruault-Jungblut S, Fisher N, Ropraz P, Imhof BA, Matthes T. Homing of human B cells to lymphoid organs and B-cell lymphoma engraftment are controlled by cell adhesion molecule JAM-C. *Cancer Res.* 2013;73(2):640-651.
31. Cyster JG. Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science.* 1999;286:2098-2102.
32. Lee JC, Hoehn D, Schechter J, Murty VV, Mansukhani MM, Alobeid B, Bhagat G. Lymphoid follicle colonization by Bcl-2bright+CD10+ B-cells ("follicular lymphoma in situ") at nodal and extranodal sites can be a manifestation of follicular homing of lymphoma. *Human Pathology.* 2013; Article in press.
33. Shetty S, Bruns T, Weston CJ, Stamataki Z, Oo YH, Long HM, Reynolds GM, Pratt G, Moss P, Jalkanen S, Hubsher SG, Lalor PF, Adams DH. Recruitment Mechanisms of Primary and Malignant B-cells to the Human Liver. 2012;56(4):1521-1531.
34. Muraro E, Martorelli D, Dolcetti R. Successes, failures and new perspectives of idiotypic vaccination for B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(5):-.

35. Vrzalikova K, Vockerodt M, Leonard S, Bell A, Wei W, Schrader A, Wright KL, Kube D, Rowe M, Woodman CB, Murray PG. Down-regulation of Blimp1 $\alpha$  by the EBV oncogene, LMP1, disrupts the plasma cell differentiation programme and prevents viral replication in B cells; implications for the pathogenesis of EBV-associated B cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(22):5907-5917.
36. Vrzalikova K, Leonard S, Fan Y, Bell A, Vockerodt M, Flodr P, Wright KL, Rowe M, Tao Q, Murray PG. Hypomethylation and Over-Expression of the Beta isoform of BLIMP1 is Induced by Epstein-Barr Virus Infection of B cells; Potential Implications for the Pathogenesis of EBV-Associated Lymphomas. *Pathogens*. 2012;1(2):83-101.
37. Vrzalikova K, Woodman CB, Murray PG. BLIMP1a, the master regulator of plasma cell differentiation is a tumor suppressor gene in B cell lymphomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic*. 2012;156(1):1-6.
38. Aviles A, Nambo MJ, Huerta-Guzman J, Silva L, Neri N. Rituximab in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma primary of the lung. *Hematology*. 2013 Mar;18(2):81-4.
39. Kojima M, Nishikii H, Takizawa J, Aoki S, Noguchi M, Chiba S, Ando K, Nakamura N. MYC rearrangements are useful for predicting outcomes following rituximab and chemotherapy: multicenter analysis of Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Mar 8.
40. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):323-32.
41. Kwanhian W, Lenze D, Alles J, Motsch N, Barth S, Döll C, Imig J, Hummel M, Tinguely M, Trivedi P, Lulitanond V, Meister G, Renner C, Grässer FA. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med*. 2012 Oct;1(2):141-55.
42. De S, Shaknovich R, Riester M, Elemento O, Geng H, Kormaksson M, Jiang Y, Woolcock B, Johnson N, Polo JM, Cerchietti L, Gascoyne RD, Melnick A, Michor F. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003137.

43. Gouveia GR, Siqueira SA, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):447-51.
44. Mundi JP, Leger M, Terushkin V, Fischer M, Patel R, Meehan S, Latkowski JA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Dermatol Online J.* 2012 Dec 15;18(12):25.
45. Wenzel SS, Grau M, Mavis C, Hailfinger S, Wolf A, Madle H, Deeb G, Dörken B, Thome M, Lenz P, Dirnhofer S, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Tzankov A, Lenz G. MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* 2012 Dec 21.
46. Bürgesser MV, Gualco G, Diller A, Natkunam Y, Bacchi CE. Clinicopathological features of aggressive B-cell lymphomas including B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell and Burkitt lymphomas: a study of 44 patients from Argentina. *Ann Diagn Pathol.* 2013 Jun;17(3):250-5.
47. Berglund M, Hedström G, Amini RM, Enblad G, Thunberg U. High expression of microRNA-200c predicts poor clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Rep.* 2013 Feb;29(2):720-4.
48. Muffly LS, Smith SM. Prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: the picture continues to come into focus. *Cancer.* 2013 Mar 15;119(6):1129-31.
49. Nakayama S, Yokote T, Iwaki K, Takayama A, Tsuji M, Hanafusa T. Triple-hit B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma associated with a novel complex karyotype including t(2;3)(q21;q27), t(8;14)(q24;q32) and t(14;18)(q32;q21). *Br J Haematol.* 2013 Mar;160(5):569.
50. Mationg-Kalaw E, Tan LH, Tay K, Lim ST, Tang T, Lee YY, Tan SY. Does the proliferation fraction help identify mature B cell lymphomas with double- and triple-hit translocations? *Histopathology.* 2012 Dec;61(6):1214-8.
51. Zhao X, Fan R, Lin G, Wang X. Chromosome abnormalities in diffuse large B-cell lymphomas: analysis of 231 Chinese patients. *Hematol Oncol.* 2012 Nov 8.

52. Barton S, Hawkes EA, Wotherspoon A, Cunningham D. Are we ready to stratify treatment for diffuse large B-cell lymphoma using molecular hallmarks? *Oncologist*. 2012;17(12):1562-73.
53. Roschewski M, Dunleavy K, Wilson WH. Diffuse large B cell lymphoma: molecular targeted therapy. *Int J Hematol*. 2012 Nov;96(5):552-61.
54. Couronné L, Ruminy P, Wautier-Rascalou A, Rainville V, Cornic M, Picquenot JM, Figeac M, Bastard C, Tilly H, Jardin F. Mutation mismatch repair gene deletions in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013 May;54(5):1079-86.
55. Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2012 Oct 11;5:64.
56. Habara T, Sato Y, Takata K, Iwaki N, Okumura H, Sonobe H, Tanaka T, Orita Y, Al-Kader LA, Asano N, Ennishi D, Yoshino T. Germinal center B-cell-like versus non-germinal center B-cell-like as important prognostic factor for localized nodal DLBCL. *J Clin Exp Hematop*. 2012;52(2):91-9.
57. Kuper-Hommel MJ, Schreuder MI, Gemmink AH, van Krieken JH. T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes occurs in extranodal diffuse large B-cell lymphomas of the breast and testis. *Mod Pathol*. 2013 Mar;26(3):421-7.
58. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological and biological spectrum of diffuse large B-cell lymphoma in the World Health Organization classification. *Cancer J*. 2012 Sep-Oct;18(5):411-20.
59. Bodoor K, Matalaka I, Hayajneh R, Haddad Y, Gharaibeh W. Evaluation of BCL-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3037-46.
60. Cohen M, De Matteo E, Narbaitz M, Carreño FA, Preciado MV, Chabay PA. Epstein-Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular association and latency patterns: analysis of viral role in tumor microenvironment. *Int J Cancer*. 2013 Apr 1;132(7):1572-80.
61. Kobayashi T, Tsutsumi Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Mizutani S, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Asano N, Nakamura S, Kuroda J, Taniwaki M. Double-hit

lymphomas constitute a highly aggressive subgroup in diffuse large B-cell lymphomas in the era of rituximab. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Nov;42(11):1035-42.

62. Sebastián E, Alcoceba M, Balanzategui A, Marín L, Montes-Moreno S, Flores T, González D, Sarasquete ME, Chillón MC, Puig N, Corral R, Pardal E, Martín A, González-Barca E, Caballero MD, San Miguel JF, García-Sanz R, González M. Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and IGHV4-34 as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1879-88.
63. Zha X, Yin Q, Tan H, Wang C, Chen S, Yang L, Li B, Wu X, Li Y. Alteration of the gene expression profile of T-cell receptor  $\alpha\beta$ -modified T-cells with diffuse large B-cell lymphoma specificity. *Hematology*. 2012 Sep 12.
64. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, Rodig SJ, Hao Y, Yeda KT, Ingulizian H, Mermel C, Currie T, Dogan A, Kutok JL, Beroukhi R, Neuberg D, Habermann TM, Getz G, Kung AL, Golub TR, Shipp MA. Integrative analysis reveals an outcome-associated and targetable pattern of p53 and cell cycle deregulation in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2012 Sep 11;22(3):359-72.
65. Barrans SL, Crouch S, Care MA, Worrillow L, Smith A, Patmore R, Westhead DR, Tooze R, Roman E, Jack AS. Whole genome expression profiling based on paraffin embedded tissue can be used to classify diffuse large B-cell lymphoma and predict clinical outcome. *Br J Haematol*. 2012 Nov;159(4):441-53.
66. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, Mungall AJ, Goya R, Huff R, Scott DW, Ding J, Roth A, Chiu R, Corbett RD, Chan FC, Mendez-Lago M, Trinh DL, Bolger-Munro M, Taylor G, Hadj Khodabakhshi A, Ben-Neriah S, Pon J, Meissner B, Woolcock B, Farnoud N, Rogic S, Lim E, Johnson NA, Shah S, Jones S, Steidl C, Holt R, Birol I, Moore R, Connors JM, Gascoyne RD, Marra MA. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole genome sequencing. *Blood*. 2013 May 22. [Epub ahead of print]
67. Bu R, Hussain AR, Al-Obaisi KA, Ahmed M, Uddin S, Al-Kuraya KS. Bortezomib inhibits proteasomal degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and induces Mitochondrial dependent Apoptosis in Activated B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013 May 23. [Epub ahead of print]

68. Jain P, Fayad LE, Rosenwald A, Young KH, O'Brien S. Recent advances in de novo CD5 Diffuse Large B cell Lymphoma (DLBCL). *Am J Hematol*. 2013 May 22. doi: 10.1002/ajh.23467. [Epub ahead of print]
69. Boone JM, Zhang D, Fan F. Lymphomatoid granulomatosis: a case report with unique clinical and histopathologic features. *Ann Clin Lab Sci*. 2013 Spring;43(2):181-5.
70. Gyan E, Damotte D, Courby S, Sénécal D, Quittet P, Schmidt-Tanguy A, Anne B, Le Gouill S, Lamy T, Fontan J, Maisonneuve H, Alexis M, Dreyfus F, Tournilhac O, Laribi K, Philippe PS, Nina A, Cartron G, Gressin R; the GOELAMS Group. High response rate and acceptable toxicity of a combination of rituximab, vinorelbine, ifosfamide, mitoxantrone and prednisone for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma in first relapse: results of the R-NIMP GOELAMS study. *Br J Haematol*. 2013 May 21. doi: 10.1111/bjh.12379. [Epub ahead of print]
71. Chow A, Phillips M, Siew T, Cull G, Augustson B, Ward M, Joske D. Prognostic Nomogram for Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Incorporating the International Prognostic Index (IPI) with Interim-Positron Emission Tomography (Interim-PET) Findings. *Intern Med J*. 2013 May 21. doi: 10.1111/imj.12194. [Epub ahead of print]
72. Saba NS, Dang D, Saba J, Cao C, Janbain M, Maalouf B, Safah H. Bortezomib in plasmablastic lymphoma: a case report and review of the literature. *Onkologie*. 2013;36(5):287-91. doi: 10.1159/000350325. Epub 2013 Apr 5.
73. Igawa T, Sato Y, Takata K, Iwaki N, Tanaka T, Asano N, Maeda Y, Orita Y, Nakamura N, Nakamura S, Yoshino T. De novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphomas show high specificity for cyclin D2 expression. *Diagn Pathol*. 2013 May 15;8:81.
74. Berthet L, Cochet A, Kanoun S, Berriolo-Riedinger A, Humbert O, Toubreau M, Dygai-Cochet I, Legouge C, Casasnovas O, Brunotte F. In Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Determination of Bone Marrow Involvement with 18F-FDG PET/CT Provides Better Diagnostic Performance and Prognostic Stratification Than Does Biopsy. *J Nucl Med*. 2013 May 14. [Epub ahead of print]
75. Saraceni C, Agostino N, Cornfield DB, Gupta R. Plasmablastic lymphoma of the maxillary sinus in an HIV-negative patient: a case report and literature review. *Springerplus*. 2013 Apr 3;2(1):142.

76. Thompson RC, Vardinogiannis I, Gilmore TD. The Sensitivity of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell Lines to Histone Deacetylase Inhibitor-Induced Apoptosis Is Modulated by BCL-2 Family Protein Activity. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62822. doi: 10.1371/journal.pone.0062822. Print 2013.
77. Liapis K, Clear A, Owen A, Coutinho R, Greaves P, Lee AM, Montoto S, Calaminici M, Gribben JG. The microenvironment of AIDS-related diffuse large-B-cell lymphoma provides insight into the pathophysiology and indicates possible therapeutic strategies. *Blood*. 2013 May 7. [Epub ahead of print]
78. Ok CY, Papathomas TG, Medeiros LJ, Young KH. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood*. 2013 May 6. [Epub ahead of print]
79. Tisi MC, Bozzoli V, Giachelia M, Massini G, Ricerca BM, Maiolo E, D'Alo' F, Larocca LM, Piciocchi A, Tjalsma H, Swinkels DW, Voso MT, Leone G, Hohaus S. Anemia in Diffuse Large B cell Non-Hodgkin Lymphoma: The Role of IL-6, Hepcidin and Erythropoietin. *Leuk Lymphoma*. 2013 May 6. [Epub ahead of print]
80. Lynnhtun K, Varikatt W, Pathmanathan N. B cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B cell lymphoma and classical hodgkin lymphoma: Diagnosis by fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2013 Apr 30. doi: 10.1002/dc.22967.
81. Zhou D, Xie WZ, Hu KY, Huang WJ, Wei GQ, He JS, Shi JM, Luo Y, Li L, Zhu JJ, Zhang J, Lin MF, Ye XJ, Cai Z, Huang H. Prognostic Values of Various Clinical Factors and Genetic Subtypes for Diffuse Large B-cell lymphoma Patients: A Retrospective Analysis of 227 Cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):929-34.
82. Bhagavathi S, Wilson JD. Primary central nervous system lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Nov;132(11):1830-4.
83. Wong KK, Prepageran N, Peh SC. Prognostic subgroup distribution in diffuse large B-cell lymphoma of the upper aerodigestive tract. *Pathology*. 2009 Feb;41(2):133-9.
84. Friedberg JW, Fisher RI. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008 Oct;22(5):941-52.

85. Hartmann EM, Ott G, Rosenwald A. Molecular biology and genetics of lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008 Oct;22(5):807-23.
86. Wang J, Chen C, Lau S, Raghavan RI, Rowsell EH, Said J, Weiss LM, Huang Q. CD3-positive large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2009 Apr;33(4):505-12.
87. Cerhan JR, Liu-Mares W, Fredericksen ZS, Novak AJ, Cunningham JM, Kay NE, Dogan A, Liebow M, Wang AH, Call TG, Habermann TM, Ansell SM, Slager SL. Genetic variation in tumor necrosis factor and the nuclear factor-kappaB canonical pathway and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Nov;17(11):3161-9.
88. Espinosa I, Briones J, Bordes R, Brunet S, Martino R, Sureda A, Sierra J, Prat J. Activation of the NF-kappaB signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications. *Histopathology.* 2008 Oct;53(4):441-9.
89. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 2006 Oct 30;72(9):1161-79.
90. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, Chhanabhai M, Brinkman RR, Connors JM, Weng AP, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood.* 2009 Apr 16;113(16):3773-80.
91. Takeuchi I, Tagawa H, Tsujikawa A, Nakagawa M, Katayama-Suguro M, Guo Y, Seto M. The potential of copy number gains and losses, detected by array-based comparative genomic hybridization, for computational differential diagnosis of B-cell lymphomas and genetic regions involved in lymphomagenesis. *Haematologica.* 2009 Jan;94(1):61-9.
92. Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF-kappaB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma.* 2008 Nov;49(11):2048-58.
93. Van Roosbroeck K, Cools J, Dierickx D, Thomas J, Vandenberghe P, Stul M, Delabie J, De Wolf-Peeters C, Marynen P, Wlodarska I. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica.* 2010 Mar;95(3):509-13.



94. Pittaluga S, Jaffe ES. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2010 Mar;95(3):352-6.
95. Singh RR, Kim JE, Davuluri Y, Drakos E, Cho-Vega JH, Amin HM, Vega F. Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1025-36.
96. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, Wijayaweera SS, Dixon SV, Kim H, Cox KL, Kerr JP, Johnston DA, Johnson PW, Verbeek JS, Glennie MJ, Cragg MS. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*. 2010 Jun 24;115(25):5191-201.
97. Murawski N, Zwick C, Pfreundschuh M. Unresolved issues in diffuse large B-cell lymphomas. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010 Mar;10(3):387-402.
98. Yamamoto W, Tomita N, Watanabe R, Hattori Y, Nakajima Y, Hyo R, Hashimoto C, Motomura S, Ishigatsubo Y. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2010 Jul;85(1):6-10.
99. Wang E, Kulbacki E. Diffuse large B-cell lymphoma with Dutcher bodies. *Eur J Haematol*. 2010 Aug;85(2):180.
100. Dasmahapatra G, Lembersky D, Kramer L, Fisher RI, Friedberg J, Dent P, Grant S. The pan-HDAC inhibitor vorinostat potentiates the activity of the proteasome inhibitor carfilzomib in human DLBCL cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4478-87.
101. Sajid RM, Qureshi A. Involvement of bone marrow with intravascular large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2010;3(1):39-41.
102. Niitsu N, Okamoto M, Tamaru JI, Yoshino T, Nakamura N, Nakamura S, Ohshima K, Nakamine H, Hirano M. Clinicopathologic characteristics and treatment outcome of the addition of rituximab to chemotherapy for CD5-positive in comparison with CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21(10):2069-74.
103. Klapproth K, Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol*. 2010 May;149(4):484-97.

104. Larouche JF, Berger F, Chassagne-Clément C, Ffrench M, Callet-Bauchu E, Sebban C, Ghesquières H, Broussais-Guillaumot F, Salles G, Coiffier B. Lymphoma recurrence 5 years or later following diffuse large B-cell lymphoma: clinical characteristics and outcome. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20;28(12):2094-100.
105. Gutiérrez A, Mestre F, Pérez-Manga G, Rodríguez J. Diffuse large B-cell lymphoma in the older. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Apr;78(1):59-72.
106. May PC, Foot N, Dunn R, Geoghegan H, Neat MJ. Detection of cryptic and variant IGH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Apr 1;198(1):71-5.
107. Mociková H. Prognostic significance of absolute lymphocyte count and lymphocyte subsets in lymphomas. *Prague Med Rep*. 2010;111(1):5-11.
108. Ujjani C, Cheson BD. Monoclonal antibodies in advanced B-cell lymphomas. *Oncology (Williston Park)*. 2010 Feb;24(2):156-66.
109. Zwick C, Murawski N, Pfreundschuh M; German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. Rituximab in high-grade lymphoma. *Semin Hematol*. 2010 Apr;47(2):148-55.
110. Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, Kelly JC, Jaffe ES. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol*. 2010 Jul;23(7):991-9.
111. Seegmiller AC, Garcia R, Huang R, Maleki A, Karandikar NJ, Chen W. Simple karyotype and bcl-6 expression predict a diagnosis of Burkitt lymphoma and better survival in IG-MYC rearranged high-grade B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2010 Jul;23(7):909-20.
112. Jardin F, Coiffier B. TP53 and outcome in DLBCL: not only the coding region. *Blood*. 2013 May 30;121(22):4433-4.
113. Dupire S, Coiffier B. Targeted treatment and new agents in diffuse large B cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2010 Jul;92(1):12-24.
114. Chan WJ. Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2010 Sep;92(2):219-30.

115. Hoeller S, Schneider A, Haralambieva E, Dirnhofer S, Tzankov A. FOXP1 protein overexpression is associated with inferior outcome in nodal diffuse large B-cell lymphomas with non-germinal centre phenotype, independent of gains and structural aberrations at 3p14.1. *Histopathology*. 2010 Jul;57(1):73-80.
116. Thunberg U, Enblad G, Turesson I, Berglund M. Genetic variation in tumor necrosis factor and risk of diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: differences between subgroups in Swedish patients. *Leuk Lymphoma*. 2010 Aug;51(8):1563-6.
117. Tilly H, Dreyling M; ESMO Guidelines Working Group. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 5:v172-4.
118. Michallet AS, Trotman J, Tychyj-Pinel C. Role of early PET in the management of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2010 Sep;22(5):414-8.
119. Matsue K, Asada N, Odawara J, Aoki T, Kimura S, Iwama K, Fujiwara H, Yamakura M, Takeuchi M. Random skin biopsy and bone marrow biopsy for diagnosis of intravascular large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2011 Apr;90(4):417-21.
120. Saurel CA, Personett DA, Edenfield BH, Solberg LA, Jiang L, Menke DM, Tun HW. Molecular analysis of intravascular large B-cell lymphoma with neoangiogenesis. *Br J Haematol*. 2011 Jan;152(2):234-6.
121. Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J Biol Chem*. 2011 Jan 21;286(3):1675-82.
122. Riihijärvi S, Taskinen M, Jerkeman M, Leppä S. Male gender is an adverse prognostic factor in B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Eur J Haematol*. 2011 Feb;86(2):124-8.
123. Oschlies I, Burkhardt B, Salaverria I, Rosenwald A, d'Amore ES, Szczepanowski M, Koch K, Hansmann ML, Stein H, Möller P, Reiter A, Zimmermann M, Rosolen A, Siebert R, Jaffe ES, Klapper W. Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell

lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica*. 2011 Feb;96(2):262-8.

124. Kim SJ, Oh SY, Kim JS, Kim H, Lee GW, Won JH, Shin HJ, Yang DH, Choi CW, Park J, Kim WS, Suh C. Secondary central nervous system (CNS) involvement in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a therapeutic dilemma. *Ann Hematol*. 2011 May;90(5):539-46.
125. Ishida T, Ueda R. Immunopathogenesis of lymphoma: focus on CCR4. *Cancer Sci*. 2011 Jan;102(1):44-50.
126. Zainuddin N, Kanduri M, Berglund M, Lindell M, Amini RM, Roos G, Sundström C, Enblad G, Rosenquist R. Quantitative evaluation of p16(INK4a) promoter methylation using pyrosequencing in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2011 Apr;35(4):438-43.
127. Flowers CR, Sinha R, Vose JM. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin*. 2010 Nov-Dec;60(6):393-408.
128. Ma SD, Hegde S, Young KH, Sullivan R, Rajesh D, Zhou Y, Jankowska-Gan E, Burlingham WJ, Sun X, Gulley ML, Tang W, Gumperz JE, Kenney SC. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol*. 2011 Jan;85(1):165-77.
129. Huang EP, Fridlyand J, Lewin-Koh N, Yue P, Shi X, Dornan D, Burington B. Statistical techniques to construct assays for identifying likely responders to a treatment under evaluation from cell line genomic data. *BMC Cancer*. 2010 Oct 27;10:586.
130. Imig J, Motsch N, Zhu JY, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M, Faggioni A, Trivedi P, Meister G, Renner C, Grässer FA. microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res*. 2011 Mar;39(5):1880-93.
131. Briones J. Targeted therapy of BCL6-dependent diffuse large B-cell lymphomas by heat-shock protein 90 inhibition. *Briones J. Expert Rev Hematol*. 2010 Apr;3(2):157-9.
132. Katzenstein AL, Doxtader E, Narendra S. Lymphomatoid granulomatosis: insights gained over 4 decades. *Am J Surg Pathol*. 2010 Dec;34(12):e35-48.

133. Gualco G, Weiss LM, Barber GN, Bacchi CE. Diffuse large B-cell lymphoma involving the central nervous system. *Int J Surg Pathol*. 2011 Feb;19(1):44-50.
134. de Jong D, Balagué Ponz O. The molecular background of aggressive B cell lymphomas as a basis for targeted therapy. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):274-82.
135. Wobser M, Kneitz H, Bröcker EB, Becker JC. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type, treated with a modified R-CHOP immunochemotherapy - diagnostic and therapeutic challenges. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011 Mar;9(3):204-11.
136. Singh T, Satheesh CT, Lakshmaiah KC, Suresh TM, Babu GK, Lokanatha D, Jacob LA, Halkud R. Primary bone lymphoma: a report of two cases and review of the literature. *J Cancer Res Ther*. 2010 Jul-Sep;6(3):296-8.
137. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, Kluin PM. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2319-31.
138. Tay K, Tai D, Tao M, Quek R, Ha TC, Lim ST. Relevance of the International Prognostic Index in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):e14.
139. Gilmore TD, Garbati MR. Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling as a strategy in disease therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;349:245-63.
140. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2000;96:1921-1925.
141. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.
142. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, Kanfer E, Naresh KN. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology*. 2007;51:70-79.

143. Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89:3909-3918.
144. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Clin Pathol*. 2002;29:1549-1557.
145. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998;16:2780-2795.
146. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, Dalla-Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412:341-346.
147. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Chan WC, Aoun P, Cochran GT, Pan Z, Smith LM, Lynch JC, Bociek RG, Bierman PJ, Vose JM, Armitage JO. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2005;18:1377-1384.
148. De Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Norton A, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Gascoyne RD, Salles G, Weller E. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications – a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. 2007; *J Clin Oncol*. 25:805-812.
149. Veelken H, Vik DS, Schulte MJ, Martens UM, Finke J, Schmitt-Graeff A. Immunophenotype as a prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. 2007;18:931-939.
150. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, Bernd HW, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC, Hansmann ML, Haralambieva E, Harder L, Hasenclever D, Kuhn M, Lenze D, Lichter P, Martin-Subero JI, Moller P, Muller-Hermelink HK, Ott G, Parwaresch RM, Pott C, Rosenwald A, Rosolowski M, Schwaenen C, Sturzenhofecker B, Szczepanowski M, Trautmann H, Wacker HH, Spang R, Loeffler M, Trumper L, Stein H, Siebert R. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354:2419-2430.

151. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Akasaka T, Tamaru J, Suzuki R, Kagami Y, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*. 2002;99:815-821.
152. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, Fisher RI, Kurtin PJ, Macon WR, Chhanabhai M, Felgar RE, Hsi ED, Medeiros LJ, Weick JK, Reed JC, Gascoyne RD. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*. 2006;107:4207-4213.
153. Barrans SL, Fenton JA, Banham A, Owen RG, Jack AS. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood*. 2004;104:2933-2935.
154. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M, Tilly H. LAZ3 rearrangements in non-Hodkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood*. 1994;83:2423-2427.
155. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, Linderöth J, Dictor M, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Sundström C, Rehn-Eriksson S, Backlin C, Hagberg H, Rosenquist R, Enblad G. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*. 2005;18:1113-1120.
156. Campbell J, Seymour JF, Matthews J, Wolf M, Stone J, Juneja S. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol*. 2006;76:473-480.
157. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. In: Atlas of tumor pathology. Series I, Fascicle 8. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1966.
158. Lichtenstein A, Levin AM, Lukes RJ, et al. Immunoblastic sarcoma: a clinical description. *Cancer* 1979;43:343-352.

159. Lukes RJ, Collins RD. Immunoblastic lymphoma B type. In: Tumors of the hematopoietic system. Atlas of tumor pathology. Series II, Fascicle 28. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1992:212-215.
160. Lukes RJ, Collins RD. New approaches to the classification of the lymphomata. Br J Cancer 1975;30[Suppl 2]:1-28.
161. Lennert K, Mohri W. Histopathology and diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas. In: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. New York: Springer-Verlag, 1978.
162. Ioachim HL, Dorsett B, Cronin W, et al. Acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas : clinical pathologic, immunologic and viral characteristics of 111 cases. Human Pathol 1991;22:659-673.
163. Tsimberidon AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence and therapeutic strategies. Cancer 2005;103:216-228.
164. Stein H, Hummel M. Histopathology in the light of molecular profiling. Ann Oncol 2006;17(Suppl4):5-7.
165. Cossman J, Jaffe ES, Fisher RI. Immunologic phenotypes of diffuse, aggressive, non-Hodgkin's lymphomas, correlation with clinical features. Cancer 1984;54:1310-1317.
166. Lennert K, Feller AC. Histopathology of the non-Hodgkin's lymphomas (based on the updated Kiel classification), 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992:93.
167. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, et al. Anaplastic large cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. Br J Haematol 2000;109:584-591.
168. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997;90:244-251.
169. Lukes RJ. The immunologic approach to the pathology of malignant lymphomas. Am J Clin Pathol 1979;72:657-669.



170. Hans CP, Weissenburger DD, Greinter TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse, large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.
171. Brown RS, Cambell C, Lishman SC, et al. Plasmablastic lymphoma: a new subcategory of human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Oncol* 1998;10:327-329.
172. Kwak LW, Wilson M, Weis L, et al. Clinical significance of morphologic subdivision in diffuse large cell lymphoma. *Cancer* 1991;68:1988-1993.
173. Colomo L, Loong F, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Path* 2004;28:736-747.
174. Bain B, Matutes E, Robinson D, et al. Leukaemia as a manifestation of large cell lymphoma. *Br J Haematol* 1991;77:301-310.
175. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
176. Longo DL. The REAL classification of lymphoid neoplasms: one clinician's view. *Principles and Practice of Oncology* 1995;9:1-12.
177. Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996;87:265-272.
178. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994;83:1460-1466.
179. Piris M, Brown DC, Gatter KC, et al. CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1990;17:211-218.
180. Abramson JS. T-cell/histiocyte rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis and management. *Oncologist* 2006;11:384-392.

181. Ramsay AD, Smith WJ, Isaacson PG. T-cell-rich B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1988;12:433-443.
182. Dardick I, Srinivasan R. Signet-ring cell variant of large cell lymphoma. *Ultrasctruct Pathol* 1983;5:195-200.
183. Weiss RL, Kjeldsberg CR, Colby TV, et al. Multilobated B-cell lymphomas. A study of 7 cases. *Hematol Oncol* 1985;3:79-86.
184. Lim M, Beaty M, Sorbara L, et al. T-cell/histiocytic-rich large B-cell lymphoma. A heterogeneous entity with derivation from germinal center B-cells. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1458-1466.
185. Weshi AE, Akhtar S, Mourad WA, et al. T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: Clinical presentation, management and prognostic factors: report on 61 patients and review of literature. *Leuk Lymphoma* 2007;48(9):1764-1773.
186. Pasqualucci L, Neumeister P, Goosens T, et al. Hypermutation of multiple protooncogenes in B-cell diffuse large cell lymphoma. *Nature* 2001;412:341-346.
187. Leoncini L, Delsol G, Gascoyne D, et al. Aggressive B-cell lymphomas: a review based on the workshop of the XI. meeting of the European Association for Haematopathology. *Histopathology* 2005;46:241-255.
188. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, et al. Rearrangements of the bcl-6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994;83:1757-1759.
189. Hsi ED. The search for meaningful prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001;115:481-483.
190. De Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology* 2003;43:509-528.
191. Teruya-Feldstein J, Chiao E, Filippa DA, et al. CD20-negative large-cell lymphoma with plasmablastic features: a clinically heterogeneous spectrum in both HIV-positive and -negative patients. *Ann Oncol* 2004;15:1673-1679.

192. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;102:3871-3879.
193. Choi WWL, 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* 2009;15:5494-5502.
194. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, et al. NFkB activity, function and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 2005;106(4):1392-1399.
195. Colby TV. Current histological diagnosis of lymphomatoid granulomatosis. *Mod Pathol* 2012;25:39-42.
196. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al. Prediction of Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Based on the Expression of Six Genes. *N Engl J Med* 2004;350:1828-1837.
197. Natkunam Y, Lossos IS, Taidi B, et al. Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation. *Blood* 2005;105:3979-3989.
198. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74.
199. Winter JN, Weller E, Horning SJ, et al. Rituximab (R) alters the prognostic indicator profile in diffuse aggressive non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003;102:345A.
200. Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99:1136-1143.
201. Kusam S, Vasanwala FH, Dent AL. Transcriptional repressor BCL-6 immortalizes germinal center-like B cells in the absence of p53 function. *Oncogene* 2004;23:839-844.

202. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin and Prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3460-3467.
203. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson P. CD10 and BCL-6 Expression in Paraffin Sections of Normal Lymphoid Tissue and B-Cell Lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24(6):846-852.
204. Carbone A, Gloghini A, Cabras A, Elia G. Differentiating germinal center-derived lymphomas through their cellular microenvironment. *Am J Hematol* 2009;84:435-438.
205. Murray PG, Young LS. Hodgkin's lymphoma: Molecular pathogenesis and contribution of the Epstein-Barr virus. In: E. S. Robertson, editor. *Epstein-Barr virus*. Norfolk: Caiser Academic Press;2005.
206. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:22-33.
207. Lossos IS, Levy R. Higher grade transformation of follicular lymphoma: Phenotypic tumor progression associated with diverse genetic lesions. *Semin Cancer Biol* 2003;13:191-202.
208. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27:190-202.
209. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:995-1007.
210. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* 2008;22:2226-2229.
211. Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E.: Immunohistochemical Expression of CD23 and CD40 May Identify Prognostically Favorable Subgroups of Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res* 2003;9:722-728.
212. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459:717-721.

213. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggermann m, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012;26:2159-2171.
214. Lenze D, Müller HH, Hummel M. Considerations for the use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens for clonality analysis. *J Hematopatol* 2012;5:27-34.
215. Langerak AW, Van Dongen JJM. Multiple clonal Ig/TCR products: implications for interpretation of clonality findings. *J Hematopatol* 2012;5:35-43.
216. Groenen PJTA, Van Raaij A, Van Altena MC, et al. A practical approach to diagnostic Ig/TCR clonality evaluation in clinical pathology. *J Hematopatol* 2012;5:17-25.
217. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003;102:2994-3002.
218. Sanchez ML, Almeida J, Lopez A, et al. Heterogeneity of neoplastic cells in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: biclonality versus intraclonal evolution of a single tumor cell clone. *Haematologica* 2006;91:331-339.
219. Flodr P, Látalová P, Tichý M, Kubová Z, Papajík T, Šváchová M, Vrzalíková K, Radová L, Jarošová M, Murray PG. Diffuse Large B-cell Lymphoma – The History, Current View and New Perspectives. *Neoplasma* 61, 5, 2014. doi:10.4149/neo\_2014\_062.
220. Ezell SA, Mayo M, Bihani T, et al. Synergistic induction of apoptosis by combination of BTK and dual mTORC1/2 inhibitors in diffuse large B cell lymphoma. *Oncotarget* 2014 June 7. [Epub ahead of print]
221. Collie AM, Nölling J, Divakar KM, et al. Molecular subtype classification of formaline-fixed, paraffin-embedded diffuse large B-cell lymphoma samples on the ICEPlex<sup>(R)</sup> system. *Br J Haematol*. 2014 June 25. [Epub ahead of print]
222. Nakamura N, Kuze T, Hashimoto Y, et al. Analysis of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of CD5-positive and -negative diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* 2001;15:452-457.