



AKADÉMIAI KIADÓ

A diffúz nagy B-sejtes limfóma fenotipikus, citogenetikai és expressziós profil heterogenitása – Magyarországi multicentrikus tanulmány

Hematológia-
Transzfuziológia

55 (2022) 4, 154–163

DOI:
10.1556/2068.2023.00157
© 2023 Szerző(k)

Pajor László^{1*}, Kun József², Herczeg Róbert², Gálik Bence², Ritter Zsombor³, Baliko Anett⁴, Hegedűs Géza^{†5}, Barna Tibor⁶, Czifra János⁷, Pálvölgyi Anna⁸, Östör Gabriella⁹, Babarcsi Edit¹⁰, Ligeti Erika¹¹, Kránitz Noémi¹², Bali Ottilia¹³, Bodor Anita¹⁴, Tiszlavicz László¹⁵, Pajor Gábor¹, Kajtár Béla¹, Kereskai László¹, Tornóczki Tamás¹, Alizadeh Hussain¹⁶, Gyenesei Attila² és Vályi-Nagy István¹⁰

¹ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Pathológiai Intézet, Pécs, Magyarország

² Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont, Bioinformatikai Kutatócsoport, Pécs, Magyarország

³ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Orvosi Képzőközpont, Pécs, Magyarország

⁴ Tolna Megyei Balassa János Kórház, Hematológiai Osztály, Szekszárd, Magyarország

⁵ Somogy Megyei Kaposi Mór Oktató Kórház, Patológiai Osztály, Kaposvár, Magyarország

⁶ BAZ Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, II. Pathológiai Osztály, Semmelweis Tagkórház, Miskolc, Magyarország

⁷ Tolna Megyei Balassa János Kórház, Pathológiai Osztály, Szekszárd, Magyarország

⁸ Siófok Kórház Rendelőintézet, Patológia, Siófok, Magyarország

⁹ Szent Pantaleon Kórház-Rendelőintézet, Kórbonctani és Kórszövet-tani Osztály, Dunaújváros, Magyarország

¹⁰ Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Budapest, Magyarország

¹¹ Csolnoky Ferenc Kórház, Patológiai Osztály, Veszprém, Magyarország

¹² Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház, Pathológiai Osztály, Győr, Magyarország

¹³ Kanizsai Dorottya Kórház, Pathológiai Osztály, Nagykanizsa, Magyarország

¹⁴ Békés Megyei Központi Kórház, Pathológiai Osztály, Békéscsaba, Magyarország

¹⁵ Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Patológiai Intézet, Szeged, Magyarország

¹⁶ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, I. sz. Belgyógyászati Klinika, Hematológia, Pécs, Magyarország

Beérkezett: 2022. november 18. – Átdolgozott kézirat érkezett: 2023. január 17. – Elfogadva: 2023. január 18.

A diffúz nagy B-sejtes limfóma 5 éves általános túlélése a mai kezelésekk mellett 60–70%, melynek hátterében a betegség komplex heterogenitása állhat.

Célkitűzés: Magyarországi multicentrikus tanulmányban a betegség fenotipikus, citogenetikai, genomexpressziós profil- és geográfiai heterogenitásának vizsgálata. **Módszer:** A 276 formol-paraffinos betegmintát Hans' algoritmus és dupla protein expresszor státusz alapján klasszifikáltuk. A *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* gén átrendeződéseket, valamint a *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gének nyerését interfázis citogenetikával vizsgáltuk. Az RNA-seq-alapú génexpressziós profilvizsgálat 173 formol-paraffinos mintán volt elvégezhető. **Eredmények:** A Hans' fenotípus alapján 103 (37,3%) germinális centrum B-sejt-szerű és 173 (62,7%) nem germinális B-sejt-szerű limfómát azonosítottunk, mely besorolás 82,6%-os megegyezést mutatott a genomexpressziós profilstratifikációval. Tripla aberrációt mutató limfóma nem fordult elő. Izolált *IGH::MYC* átrendeződés, valamint *MYC*, *BCL2*, *BCL6* géntöbbség mindkét Hans' csoportban jelen volt. Az *IGH::BCL2* átrendeződés izoláltan vagy kombinációban, szignifikánsan és kizárólag a germinális centrum B-sejt-szerű csoportban volt azonosítható, míg a *BCL6* átrendeződés szignifikáns halmozódást mutatott a nem germinális centrum B-sejt-szerű Hans' csoportban. A dupla

*Levelezési cím/Corr. address:
Prof. dr. Pajor László, 7624 Pécs,
Szigeti út 12.;
Tel.: +36/72/536-280.
E-mail: pajor.laszlo@pte.hu



protein expresszor fenotípus pozitív prediktív értéke mindkét Hans' csoport molekuláris alcsoportjaira alacsony, a 0,04–0,19, illetve a 0,12–0,30, tartományba esett, míg negatív prediktív értéke mindkét főcsoport összes releváns molekuláris alcsoportjában 1,00-nek felelt meg. *Következtetések:* A *IGH::MYC* átrendeződés nem Hans' csoport specifikus genotípus. Az *IGH::BCL2* átrendeződés germinális centrum, a *BCL6* átrendeződés pedig a nem germinális centrum B-sejt-szerű limfóma fémjele. A dupla protein expresszor negatív fenotípus mellett *IGH::MYC* és/vagy *IGH::BCL2* átrendeződés nem fordult elő.

KULCSSZAVAK

DLBCL, immunfenotípus, citogenetika, expressziós profil

Phenotypic, cytogenetic and expression profile heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. A Hungarian multicentric study

Heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma might explain the current 60–70% five year overall survival.

Objectives: To reveal the phenotypic, cytogenetic, genome expression profile and geographic heterogeneity of this disease in Hungary. *Methods:* Formol-paraffine tissue samples of 276 patients were stratified according to the Hans' algorithm and double protein expressor status. *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* rearrangements and gain of *MYC*, *BCL2*, *BCL6* genes were determined by interphase cytogenetics. RNA-seq based expression profiling was accomplished in 173 samples. *Results:* Hans' phenotype identified 103 (37.3%) germinal center and 173 (62.7%) non-germinal center B-cell like lymphoma, which classification corresponded in 82.6% to the genome expression profile stratification. Triple-hit lymphoma did not occur. The *IGH::MYC* rearrangement alone or excess of *MYC*, *BCL2* and *BCL6* genes existed in both Hans' groups. The *IGH::BCL2* rearrangement, alone or combined, was significantly related to germinal center B-cell like lymphoma, whereas the *BCL6* rearrangement associated significantly to the other Hans' group. The positive predictive values of double protein expressor phenotype were low in all molecular subgroups of both Hans' groups, falling into the range of 0.04–0.19 and 0.12–0.30, respectively, whereas the negative predictive values of it corresponded to 1.00 in all relevant molecular subgroups of the two Hans' groups. *Conclusions:* *IGH::MYC* rearrangement is not a Hans' group specific genotype. *IGH::BCL2* is a hallmark of the germinal center, whereas *BCL6* rearrangement is that of the non-germinal center lymphomas. The double protein expressor negative phenotype is equally exclusive for both *IGH::MYC* and *IGH::BCL2* rearrangements.

KEYWORDS

DLBCL, immunophenotype, cytogenetics, expression profiling

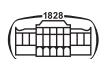
BEVEZETÉS

A leggyakoribb non-Hodgkin limfóma, a CD20 pozitív, de morfológiailag heterogén és különböző klinikai lefolyást mutató diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) a klasszikus, Lymphochip-alapú génextpressziós profil (GEP) vizsgálatok szerint legalább kettő, molekulárisan eltérő és prognosztikailag különböző betegségnek felelt meg [1]. A germinális centrum B-sejt (GCB), valamint az aktivált B-sejt (ABC)-szerű molekuláris szubtípusok létezését egy független, oligonukleotid génchip platform (Affimetrix, Santa Clara, CA) is megerősítette, és kiegészítette egy harmadik, nem osztályozható, a GCB, illetve az ABC típusú GEP mintázattól eltérő expressziós profilt mutató, de rossz prognózisú DLBCL altípussal [2, 3]. A DLBCL sejteredetének ('cell-of-origin', COO) megállapítására az immunhisztológiailag (IH) meghatározott proteinexpressziós algoritmusok is bevezetésre kerültek, melyet a GEP-alapú sejteredet-meghatározás széles körű rendelkezésre állásának hiánya miatt a WHO-2016 limfómaklasszifikáció is elfogadott [4]. Ezek közül a legelőször bevezetett és legszélesebb körben alkalmazott, a CD10, BCL6 és a MUM1 proteinek expresszióját immunhisztológiával vizsgáló Hans' algoritmus sem tudja elkülöníteni a GEP-pel nem osztályozható csoportot, és a DLBCL

betegséget GCB-szerű és nem GCB/ABC-szerű, az előbbi javára szignifikánsan jobb klinikai lefolyást mutató csoportokba sorolja [5]. A DLBCL betegség citogenetikai heterogenitására vonatkozó növekvő ismeretanyag egy új entitás elfogadásához vezetett a WHO-2016 limfómaklasszifikációban: MYC és BCL2 és/vagy BCL6 átrendeződést (R) mutató magas malignitású B-sejtes limfóma (HGBL), melyet ezen molekuláris sajátosságok miatt tripla aberrációt ('triple hit', TH) vagy dupla aberrációt ('double hit', DH) mutató limfómának neveztek el [6].

A nagy nemzetközi tanulmányokban jelentkező ellentmondások, például az izolált MYC-R, az ebben részt vevő partnereinek, a MYC-R melletti más átrendeződések, ezen genetikai aberrációk különböző kombinációinak, továbbá a MYC, BCL2 és BCL6 gének kópiaszám-eltéréseinek (CNA) prognosztikai szerepe nem kerültek minden vonatkozásban feloldásra. Ez magyarázza a jelenleg is intenzív, a prognózis prediktív genetikai aberrációk, mutációk, kópiaszám-eltérések vagy génfüziók feltárására irányuló kutatásokat, melyek célja a DLBCL individualis medicina típusú kezelésének megalapozása [7–20].

Multicentrikus tanulmányunkban egy reprezentatívnak vélt DLBCL betegcsoport sejteredet (COO), *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* és *BCL6* gén átrendeződés (R), illetve kópiaszám-növekedés



(CNA), valamint génexpressziós profil (GEP) szerinti vizsgálatát végeztük el annak érdekében, hogy a DLBCL ezen paraméterei geográfiai jellegzetességeit feltárjuk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat a PTE Klinikai Központ Pathológiai Intézetének konzíliumi anyagán végeztük, melyből 344, legalább 5 éves követéssel rendelkező mintát választottunk ki. Ebből mind a 7 immunhisztológiai, valamint a 4 genetikai lókuszt reprezentáló 3 iFISH-vizsgálat értékelhető eredményt 276 esetben adott. Ez a pathológiai minta (paraffinos blokk) kollekción 12 egészségügyi intézmény pathológiai osztályáról származott, melyek az affiliációban szereplő székhely szerint a következők, zárójelben a részvételi esetszámmal: Békéscsaba (6), Dunaújváros (16), DPC-OHII Budapest (30), Győr (4), Miskolc (55), Nagykanizsa (3), PTE Pécs (30), Siófok (15), Kaposvár (88), Szekszárd (14), SZTE Szeged (8), Veszprém (7). E kohorszban az FFPE blokkokból extrahált RNS és az azt követő transzkriptom új generációs szekvenálás (NGS) alapján 173 mintában volt genomexpressziós profil (GEP) vizsgálat elvégezhető.

Hisztológiai-immunhisztológiai vizsgálatok: A paraffinos blokkokból újra elvégeztük a teljes pathológiai feldolgozást, komplettáltuk az IH-profilozást, diagnóziskorrekción miatt egyetlen esetet sem kellett kizárni. Az IH-vizsgálatokhoz CD10, CD20 (Visionbiosystems Novocastra, UK), MUM1, BCL2, BCL6 (Dako, Dánia), MYC (Abcam, UK), Ki-67 (Hisztopatológia Kft., Magyarország) specifikus primér antitesteket, valamint Envision+ System-HRP (DakoCytomation, Dánia) és Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, UK) előhívó reagenseket alkalmaztunk. A Hans' algoritmus szerint legalább 30%-os pozitivitás esetén tekinthető pozitívnak a tumor egy bizonyos markerre. Az algoritmus szerint GCB-szerű csoportbesorolást kap a tumor, ha CD10+ (BCL6+/-, MUM1+/-) vagy CD10-, BCL6+, MUM1- fenotípust mutat. Nem GCB/ABC-szerű a besorolás minden egyéb - CD10-, BCL6+, MUM1+ vagy CD10-, BCL6-, MUM1+ fenotípus esetén [5]. Dupla protein expresszor (DPE) besorolást kapott a tumor kombinált BCL2 ($\geq 50\%$) és MYC ($\geq 40\%$) immunhisztológiai pozitivitás esetén [6].

Interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció (iFISH): A paraffinos blokkok 5 μm -es metszetein a mintákat iFISH-eljárással - a szonda kit gyártó előírásait követve - teszteltük MYC::IGH, IGH::BCL2, BCL6 átrendeződésre (R), valamint MYC (8q24), BCL2 (18q21) és BCL6 (3q27) nyeresre/amplifikációra (G/A). Ehhez Vysis IGH/MYC/CEP8 TC-DF, Vysis LSI IGH/BCL2 DC-DF és Vysis LSI BCL6 (ABR) DC Break Apart szondakészleteket (Abbott Molecular Inc., USA) használtunk fel. Az iFISH-reakciókat a gyártó előírásai szerint, Zeiss Axioplan-MOT II fluoreszcens mikroszkópban 'grid sampling' és 'color rationing' módszerekkel értékeltük ki [21]. Átrendeződés (R) pozitívnak tekintettük a tumort IGH/MYC, IGH/BCL2, illetve BCL6 szonda esetén, ha a fúziós, illetve a disszociált iFISH jeleket a sejtmagok legalább 50%-a hordozta. A nyeres/amplifikáció (G/A) definíciója MYC, BCL2 és BCL6 esetében magában foglalta a releváns

kromoszóma poliploiditásának hiányát és/vagy a sejtmagok legalább 50%-ban legalább 1 kópia géntöbblet kimutathatóságát, valamint dupla parányok ['double minutes'] és/vagy gyöngyfüzérszerű ['beaded lace-like'] jelek és/vagy megszámlálhatatlan (homogén festődésű régió - 'HSR' vagy felhőszerű - 'cloudy-like') szignálok jelenlétét.

RNS-könyvtár-készítés és szekvenálás: A paraffinos blokkok 10 μm -es metszeteiből RNeasy FFPE isol kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával történt az RNS-izolálás, majd NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, USA) készülékkel a mennyiség és a tisztasági fok meghatározása. Az RNS-könyvtárak készítését QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (Lexogen, Ausztria) segítségével végeztük. Mintánként 100 ng total RNS reverz transzkripciója valósult meg egyszálú komplementer DNS-re (cDNS) oligodT primerekkel, majd az RNS eltávolításra került. Ezt követően a második cDNS-szálat szintetizáltuk random primerek segítségével, majd a termékeket tisztítottuk mágneses gyöngyökkel. Végül a könyvtárakat amplifikáltuk, és vonalkód-szekvenciával (barcode) láttuk el PCR alkalmazásával. Az elkészült könyvtárakban TapeStation 4200 (Agilent) készülékkel ellenőriztük adapter dimer PCR műtermékek képződését. A QuantSeq könyvtárakat Illumina NextSeq550 készülékkel szekvenáltuk 75 bp single-end leolvasási módban.

Bioinformatika - statisztika: A leolvasott szekvenciákat a *Homo sapiens* referencia genomra illesztettük (*GRCh37 Ensembl*) a STAR v2.5.3a programmal [22]. Ezután a fehérjekódoló génekre illesztett readok számát meghatároztuk a HTSeq programcsomaggal (v0.11.1) [22]. A gén count adatokat normalizáltuk az M-értékek trimmelt átlaga (TMM) módszerrel az edgeR R/Bioconductor programcsomagokkal (v3.28, R v3.6.0, Bioconductor v3.9) [23]. A statisztikai próbákhoz az adatokat logtranszformáltuk a voom megközelítéssel a limma programcsomaggal [24, 25]. A normalizált gén count adatokat transzkriptum per millió (TPM) formában reprezentáltuk. A limma csomag segítségével összehasonlítottuk a csoportokat lineáris modell alkalmazásával, amellyel fold change és módosított p-értékeket, majd Benjamini-Hochberg-módszerrel a False Discovery Rate (FDR) megközelítéssel illesztett p-értékeket számoltunk. A differenciáltan kifejezett gének TPM-értékeit hierarchikus klaszterelemzéssel, Pearson-korreláció és átlagos kapcsolttság (average linkage) módszerrel vizsgáltuk és hőtérképpel vizualizáltuk a *heatmap* R csomaggal (v1.0.12). A Wan-Hui és mtsai (2020) által meghatározott, a DLBCL-sejteredet (cell-of-origin, COO) csoportosítással szignifikánsan összefüggő 32 gén közül a mintáinkban kimutatott transzkriptttal rendelkező 28 gén TPM-értékei alapján hierarchikus klaszterelemzést és hőtérképen történő vizualizációt alkalmaztunk a fenti módon [26].

Chi-négyzet-tesztet alkalmaztunk a különböző fenotípus sejtparaméterek megoszlásának vizsgálatára. Ehhez az R stats csomagból a *chiq.test* függvényt (R Core Team, 2021) használtuk fel. A pozitív és negatív prediktív értéket (PPÉ, NPÉ) a különböző geno- és fenotípus-csoportok vs. DPE státusz kontingenciátáblázataiból nyert valódi pozitív (VP), álpozitív (ÁP), valódi negatív (VN),



álnegatív (ÁN) értékek alapján, a VP/VP+ÁP és VN/VN+ÁN képletek alapján számoltuk.

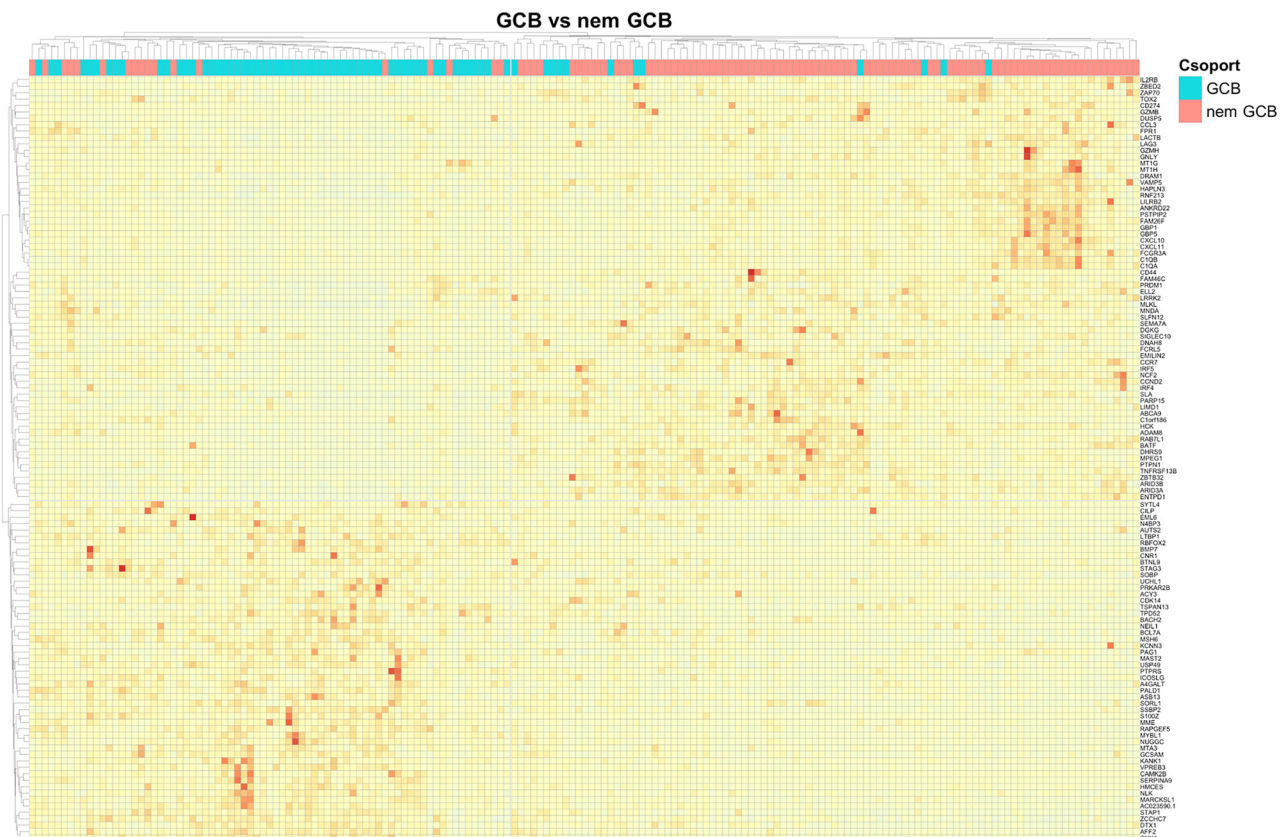
EREDMÉNYEK

A teljes immunhisztológiai és iFISH-panellel értékelhető eredményt adó, összesen 276 DLBCL-tumormintát vizsgálhattunk. A sejteredet (COO) vonatkozásában, a Hans' immunhisztológiai algoritmus alapján, a 276 tumorból 103 (37,3%) GCB-sejt-szerű, míg 173 (62,7%) nem GCB-sejt-szerű DLBCL altípusba sorolódott. A GEP-vizsgálat során azonosított differenciáltan expresszált gének a GCB vs. nem GCB Hans' DLBCL-csoportokat magas hatékonysággal különítették el. A Hans algoritmus, valamint a GEP-vizsgálat alapján azonos csoport besorolást nyert az összes eset 82,6%-a (1. ábra). Az ábra jobb felső zónájában, a döntően Hans' nem GCB fenotípusú esetek között alcsoportosodást, azaz GEP-heterogenitást mutat a hőtérkép. A GEP-vizsgálat ugyanakkor, szignifikáns heterogenitást tárt fel az egyaránt Hans' GCB besorolásba tartozó, 6/103 (5,8%) illetve a 22/103 (21,3%) gyakoriságot képviselő CD10+/MUM1+ vs BCL6+ csoportok között (2. ábra).

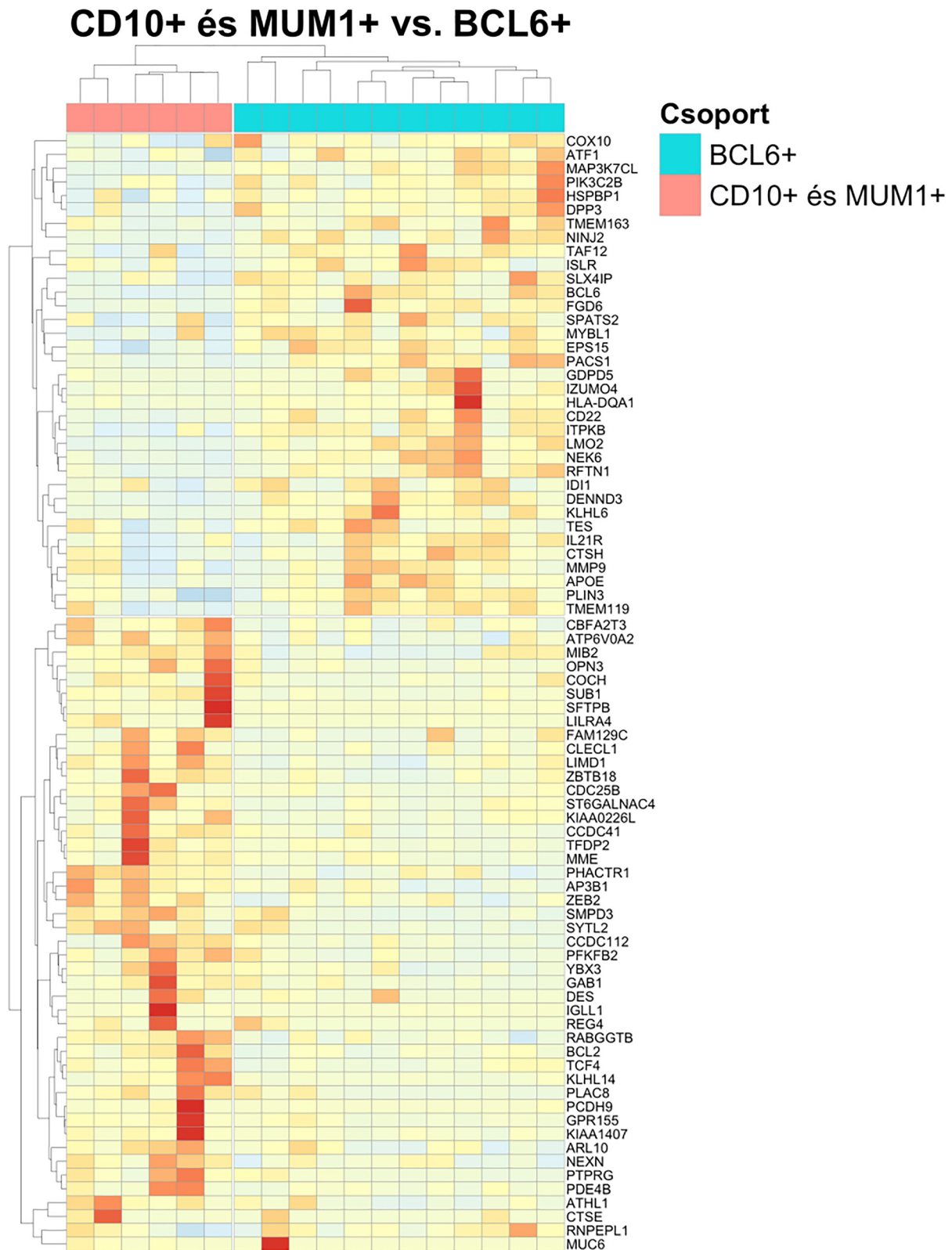
Az *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* fúzió illetve *BCL6* törés típusú átrendeződések (R) incidenciája a teljes vizsgált DLBCL-kohorszban 16/276 (5,8%), 20/276 (7,2%), illetve 46/276 (16,7%) értékeknek felelt meg (1. táblázat). A *MYC* gén

amplifikációja 7/276 (2,5%) gyakorisággal fordult elő, melyet az átlagos 2,55x allélarány (kb. 3 géndózis többlet) jellemzett. A *BCL2* amplifikáció ugyanezen adatai: 37/276 (13,4%), átlagosan 1,95 allélarány (kb. 2 gén dózis többlet). A *BCL6* amplifikációja csak 0,7%-ban (2/276) volt észlelhető, 4,05–4,22 fúziós jel/mag arány (kb. 2x gén dózis többlet) és gyöngyfüzérű amplifikáció mellett. Az amplifikáció értékelésénél nem vettük figyelembe a megszámlálhatatlan, homogén festődési régió ('HSR'), valamint felhőszerű ('cloudy like') iFISH-jeleket tartalmazó magokat. A *MYC* és a *BCL2* gén vonatkozásában egyaránt 2–2/276 (0,7–0,7%) gyakorisággal fordultak elő ilyen iFISH-jelenségek a DLBCL-kohorszban (3. ábra).

Az izolált *IGH::MYC* aberráció 6/103 (5,8%), illetve 6/173 (3,5%) arányban fordult elő a GCB, valamint a nem GCB csoportban, és nem mutatott szignifikánsan eltérő halmazódást a Hans' főcsoportokban. Tripla aberrációt (TH) vagy *IGH::MYC/BCL6* átrendeződés típusú dupla aberrációt (DH-2) hordozó limfóma egyik Hans' csoportban sem fordult elő. Az izolált *BCL6-R* típusú aberráció a nem GCB csoportban volt gyakoribb (33/173, 19,0%), és ezzel a fenotípussal szignifikáns összefüggést mutatott ($P = 0,013$). Az *IGH::BCL2* átrendeződés izoláltan és más aberrációval kombinációban 20/103 (19,4%) illetve 0/173 (0%) gyakorisággal fordult elő a GCB, valamint a nem GCB csoportban. Így szignifikáns halmazódást mutatott izoláltan ($P = 0$), kombinációban *IGH::MYC* átrendeződéssel (DH-1; $P = 0,018$), *BCL6*



1. ábra. Az expressziós profil alapján létrehozott hőtérképen meghatározott 2 csoport 82,6% átfedést mutatott a Hans' algoritmus szerint definiált GCB, valamint nem GCB besorolással



2. ábra. Az egyaránt a Hans' GCB csoportba tartozó CD10+, MUM1+ ■, valamint BCL6+ ■ fenotípusú csoport szignifikáns GEP-heterogenitást mutatott

töréssel ($P = 0,008$) vagy minden *IGH::BCL2* átrendeződést mutató DLBCL-re nézve ($P = 0,001$), a GCB fenotípusú limfómákban, miközben ez a genetikai konstelláció egyáltalán nem fordult elő a nem GCB fenotípusú tumorokban. Ugyanakkor a *BCL2* gént érintő aberrációk mindegyike nyeres/amplifikáció (G/A) típusú volt a nem GCB-sejt-szerű daganatokban. Ennek ellenére a *MYC*, *BCL2*, illetve *BCL6* gének kópiaszám eltéréseinek gyakorisága nem mutatott szignifikáns asszociációt egyik Hans' csoporttal sem (4. ábra).

A DPE+ státusz előfordulása magas volt a GCB (83,4%) és a nem GCB (88,4%) csoportban egyaránt és gyakorisága nem mutatott szignifikáns eltérést a két Hans' csoportban.

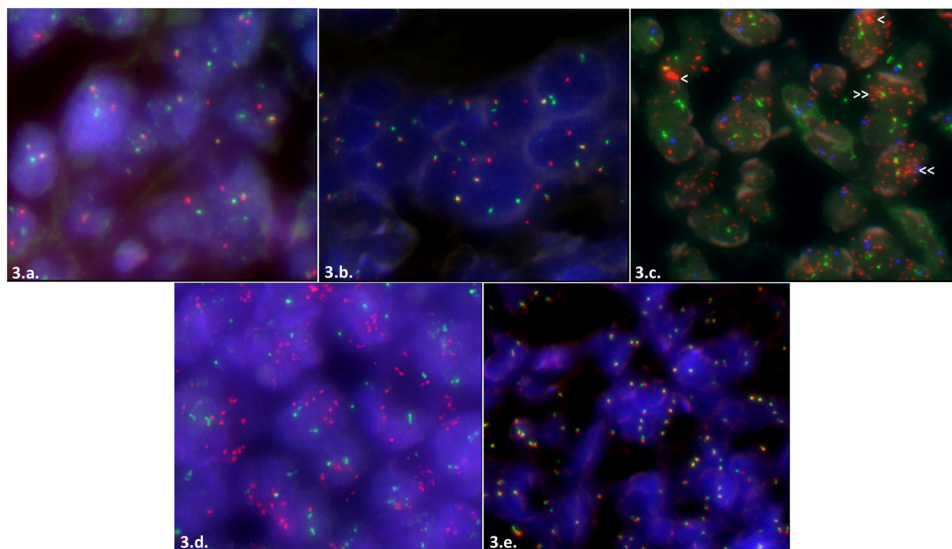
1. táblázat. A *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* és *BCL6* génátrendeződések (R), a *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gének nyeresének/amplifikációjának (G/A), valamint a megszámlálhatatlan iFISH jelek lókuszszerű gyakorisága a teljes vizsgált DLBCL-kohorszban (HSR – homogén festődésű régió)

	Átrendeződés (R)	Géntöbblet – iFISH jel	
		Nyeres/ Amplifikáció (G/A)	Megszámlálhatatlan HSR/Felhőszerű
<i>IGH::MYC</i>	16/276 (5,8%)	-	-
<i>MYC</i>	-	7/276 (2,5%)	2/276 (0,7%)
<i>IGH::BCL2</i>	20/276 (7,2%)	-	-
<i>BCL2</i>	-	37/276 (13,4%)	2/276 (0,7%)
<i>BCL6</i>	46/276 (16,7%)	-	-
<i>BCL6</i>	-	2/276 (0,7%)	-

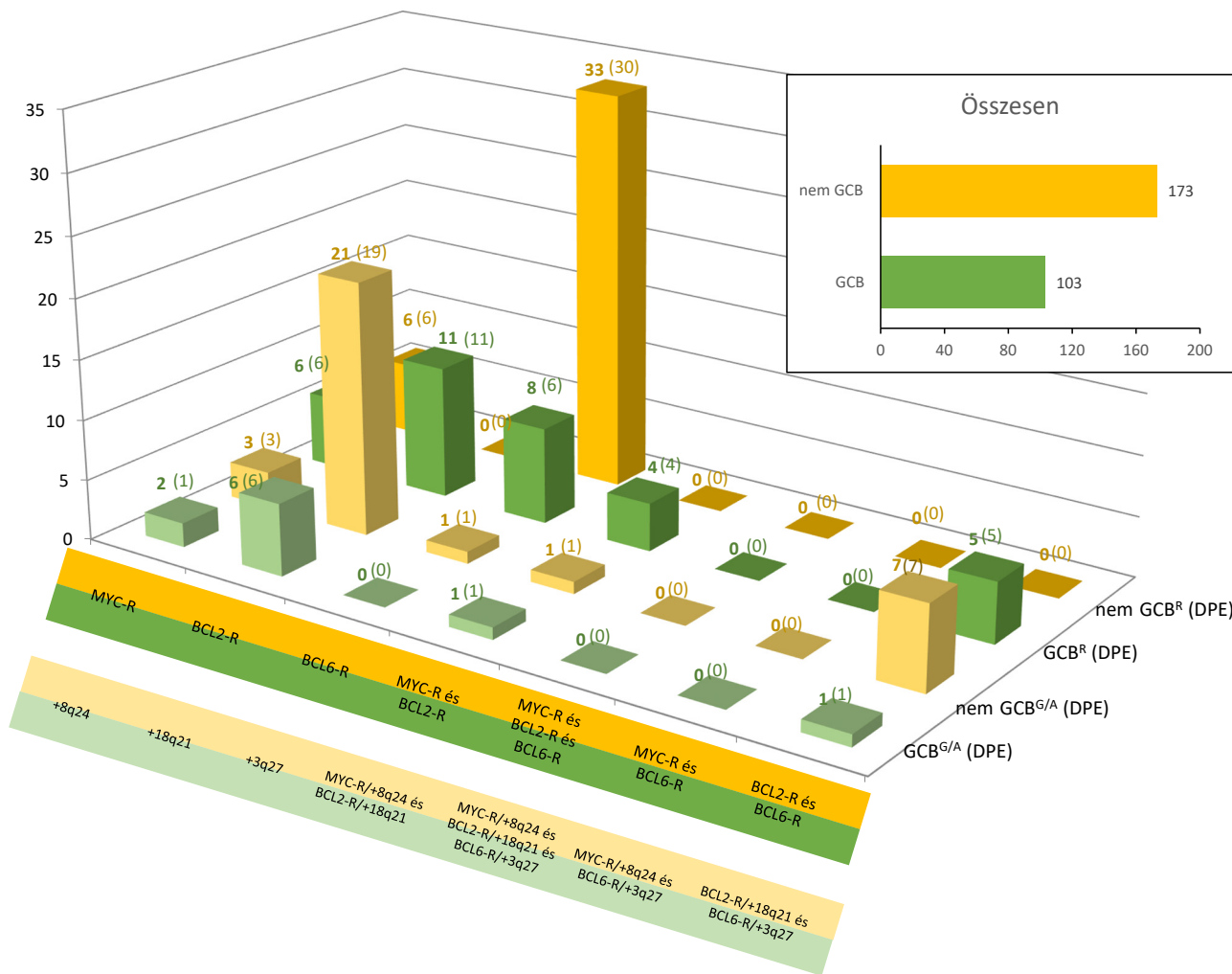
A DPE+ fenotípus szignifikáns asszociációt nem mutatott a nem GCB csoportban a csak izoláltan előforduló *MYC*-R+ és a *BCL6*-R+ alcsoportokkal, ugyanez vonatkozik a GCB csoportban a *MYC*-R típusú aberrációt, illetve a *BCL2* átrendeződést izoláltan vagy kombinációban hordozó alcsoportokra is. A DPE+ fenotípus csak a GCB csoportban és csak a *MYC* vagy *BCL2* átrendeződést izoláltan vagy bármilyen kombinációban hordozó molekuláris alcsoportra bizonyult szignifikánsan gyakoribbnak ($P = 0,02$). A DPE fenotípus pozitív prediktív értéke (PPV) a nem GCB csoport fenti 2 molekuláris alcsoportjára: 0,04–0,19. Ugyanezen érték a GCB csoport 3 molekuláris alcsoportjára a 0,12–0,30 tartományba esett (2. táblázat). A DPE fenotípus negatív prediktív értéke (NPV) a két Hans csoport összesen öt molekuláris alcsoportjából 4-ben 1,00-nek bizonyult, egyedül a nem GCB – *BCL6*-R+ alcsoportban volt alacsonyabb, 0,85.

MEGBESZÉLÉS

A leggyakoribb limfóma, a CD20+ nagy B-sejtes limfóma, a non-Hodgkin limfómák 30–40%-át teszi ki a különböző földrajzi térségekben. Ennek 80–85%-a diffúz növekedési mintázatot mutat, ezért diffúz nagy B-sejtes limfómának (DLBCL-nek) nevezik. További és ritkább, összességében 15–20%-ot kitevő, nagy B-sejtekből felépülő limfómák is léteznek, melyeket egyedi klinikopathologiai sajátosságai miatt a vizsgálatunk alatt érvényes (WHO-HAEM4R) valamint a jelenlegi (WHO-HAEM5) osztályozás is más elnevezések alatt határoz meg [6, 20, 27]. Jelen tanulmányunk tárgyát az előbbi, DLBCL csoportba tartozó betegségek



3. ábra. Típusos iFISH jel mintázatok génátrendeződés, valamint géntöbblet (nyeres/amplifikáció) esetén. **a** *MYC* piros (P) jel, *IGH* zöld (Z) jel, *IGH::MYC* átrendeződés – kolokalizált/sárga fúziós (F) jel; **b** *BCL6* telomerikus 3q27 régió P jel, centromerikus 3q27 régió Z jel, intakt *BCL6* gén – kolokalizált szignálok, *BCL6* gén törés – önálló Z/P jelek; **c** *MYC* (P), *IGH* (Z), CEP8-Aqua (A), ~9-szeres P/Z, illetve P/A arány (kb. 16 *MYC* géntöbblet), < homogén festődő régió – HSR, << felhőszerű iFISH jelölődés; **d** *BCL2* P jel, *IGH* Z jel, ~3,5-szörös P/Z amplifikáció (~5 *BCL2* géntöbblet), **e** ~4-szeres P-Z kolokalizált jel/mag (~6-szörös *BCL6* géntöbblet), telomerikus 3q27 régió Z jel, centromerikus 3q27 régió P jel; **d** és **e** gyöngyfűszerű iFISH jel mintázat – intrakromoszómális gén sokszorozódás; **a** – **e** 63x olaj immerzió



4. ábra. Az Y tengely az esetek fenotípus (GCB – zöld, illetve nem GCB – sárga) megoszlását mutatja, mely stratifikáltn kerül bemutatásra, aszerint, hogy a fenotípuscsoportban az X tengelyen jelzett aberráció átrendeződés (GCB^R – sötétzöld; nem GCB^R – sötétsárga) vagy gén nyerés/amplifikáció (GCB^{G/A} – világoszöld; nem GCB^{G/A} – világossárga) típusú volt. A dupla protein expozsor (DPE) esetek száma az egyes oszlopok feletti esetszámok mellett zárójelben jelenik meg. MYC = 8q24, BCL2 = 18q21, BCL6 = 3q27. Az IGH::MYC, IGH::BCL2, BCL6 génátrendeződések (R, ■, ■), valamint a MYC, BCL2, BCL6 gén nyerésének (G/A, □, □) gyakorisága izoláltan vagy kombinációkban a Hans' GCB (■, □), valamint nem GCB (■, □) fenotípuscsoportokban. Ha a kombinált aberrációk esetén nem mindegyik aberráció átrendeződés típusú volt, a tumor a kombinált gén nyerés típusú alcsoportba sorolódott

2. táblázat. A dupla protein expozsor (DPE) fenotípus pozitív prediktív értéke (PPV), illetve negatív prediktív értéke (NPV), valamint a DPE-pozitivitás szignifikanciaszintje a nem GCB, valamint a GCB típusú DLBCL molekuláris alcsoportjaiban.
i – izoláltan, k – kombinációban előforduló átrendeződés (R), n. sz. – nem szignifikáns

	nem GCB DLBCL		GCB DLBCL		
	MYC-R (i)	BCL6-R (i)	MYC-R (i vagy k)	BCL2-R (i vagy k)	MYC-R vagy BCL2-R (i vagy k)
DPE+PPV	0,04 n. sz.	0,19 n. sz.	0,12 n. sz.	0,23 n.sz.	0,30 P = 0.020
DPE-NPV	1,00	0,85	1,00	1,00	1,00

képezték. A Burkitt-limfóma eseteket a WHO-meghatározás alapján kizártuk. A ritka és meglehetősen szubjektív morfológiai jegyek alapján véleményezett, ún. diffúz magas malignitású B-sejtes limfóma (HGBL) esetek a tanulmány részét képezték. A DLBCL morfológiai, fenotípusos, molekuláris genetikai és geográfiai heterogenitása állhat annak háttérben, hogy a betegség 5 éves általános túlélése a mai kezelések mellett 60–70% [12].

Emiatt a DLBCL patobiológiája intenzív kutatások tárgya, melyek célja a precíziós medicina típusú kezelhetőség megalapozása. Hazánkban a DLBCL átfogó, fenotipikus, citogenetikai és génexpressziós profil (GEP) alapú együttes vizsgálata nem került még bemutatásra/publikálásra, ezért egy multicentrikus tanulmányban 276 DLBCL betegség ilyen irányú, komplex jellemzését végeztük el és adjuk közre a vizsgálatok eredményét.



A CD10, BCL6, MUM1 immunhisztokémiai reaktivitás és a Hans' algoritmus alapján a limfómák közel 1/3-a (37,3%-a) nyert GCB-sejt-szerű, míg közel 2/3-a (62,7%) nem GCB-sejt-szerű besorolást. Ez a Hans' osztályozás alapján publikált adatokban észlelt GCB típusú limfómák gyakorisági tartományának alsó határa körüli GCB típusú DLBCL arányt és jelentős nem GCB-sejt-szerű limfóma túlsúlyt mutat az általunk vizsgált beteganyagban [7, 15, 28]. A Hans' fenotípus stratifikáció ebben a tanulmányban megbízhatónak tartható, mivel a GEP vizsgálat során azonosított, differenciáltan expresszált gének, valamint a Hans' klasszifikáció alapján a DLBCL esetek 82,6%-ban azonos besorolást nyertek. Továbbá a vizsgált kohorsz Hans' osztályozása és a közelmúltban publikált, 32 génes klasszifikáló alapján végzett GEP csoport analízisünk jó korrelációt, 81,0%-ban megegyező besorolást mutatott [26]. A fenti Hans' és GEP klasszifikáció közötti eltéréseket magyarázhatja az az ismert tény, hogy a DLBCL esetek 15–20%-ot kitevő, GEP alapján nem osztályozható csoportját immunhisztológiai profil alapján sem lehet felismerni [6]. Ezt példázza az az eredményünk is, miszerint a GEP-analízis heterogenitást is mutatott mind a Hans' GCB, mind a nem GCB csoportban egyaránt. A klinikai adatok birtokában tervezzük annak vizsgálatát, hogy a homogén fenotípuscsoportokban észlelt GEP-heterogenitás képvisel-e prognosztikai heterogenitást.

DLBCL-ben az *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* fúzió, illetve a *BCL6* törés típusú átrendeződések (R) incidenciája – a nemzetközi adatok alapján – tág határok között, a 4–24%, 3–30%, illetve a 14–30% tartományban mozog [8, 9, 12–15, 28–31]. Ezen aberrációk incidenciái jelen kohorszban ezen tartományok alsó zónájába esnek. Feltűnő, hogy a nemzetközi adatok alapján a 0,5–10%, 0,5–1,5%, illetve 0–3% incidenciatartományt mutató DH-1, DH-2, illetve TH limfóma közül e vizsgálatban csak a DH-1, *MYC*-R és *BCL2*-R genotípusú limfóma mutatható ki 1,4% arányban, míg a másik kettő nem fordul elő. Ezt geográfiai különbségeken kívül nehéz lenne mással magyarázni. Nem valószínűsíthető, hogy az eredményeket befolyásolta az, hogy a *MYC*-R aberrációt az *IGH::MYC* specifikus dupla fúziós (DF) iFISH-szondával vizsgáltuk, mivel az összes *MYC* átrendeződésnek csak kb. 10%-ában szerepelnek partnerként az immunoglobulin könnyűláncok (*MYC/IGL*), a DF iFISH-szonda szenzitivitása az 'elválo' (BA) szondánál 5–10%-kal magasabb, továbbá a 40–50%-ot kitevő, nem IG génnel történő átrendeződés (*MYC*-R-nemIG) vizsgálata – ismeretlen hatása miatt – jelenleg nem elvárt [8, 9, 12, 16].

Az izolált *MYC*-R nem szignifikáns megoszlása a GCB vs. nem GCB főcsoportok között arra utalhat, hogy ez az aberráció önmagában nem tehető felelőssé a két főcsoport közötti, irodalmilag dokumentált, prognosztikai különbségért [10, 12]. Az izolált vagy kombinált *BCL2*-R GCB limfómákhoz, a *BCL6*-R nem GCB limfómákhoz mutatott szignifikáns asszociációja ezen aberrációk független, prognózist befolyásoló szerepére utalhatnak. Az a tény, hogy a *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gének kópiaszámeltéréseinek egyikénél sem lehetett szignifikáns halmozódást kimutatni a Hans' főcsoportok között, ezen genetikai eltérések prognózist nem

befolyásoló hatását vélelmezhetik. E témakörben a kópiaszámeltérések prognosztikai hatására vonatkozó, ellentmondásos publikációk sora ismert, beleértve a nagyon ritka magas grádusú amplifikáció ('megszámlálhatatlan iFISH szignál' típusú aberráció) jelentőségét, egyáltalán a kópiaszám-küszöbérték meghatározásának hiányát [12, 18, 28].

A DLBCL-ben prognosztikus genetikai eltérések, transzlokációk, amplifikációk, vizsgálata iFISH-eljárással történik. Ez azonban drága, időt, szakértő humán erőforrást és laboratóriumi technikát igénylő eljárás. Ezért felmerül, hogy előzetes szűréssel lehet-e csökkenteni az iFISH-sel vizsgálandó DLBCL szövetminták arányát, a pozitív minták vesztese nélkül. Jelen tanulmányban a prognosztikus dupla protein expresszor (DPE, *MYC* és *BCL2*) klasszifikáló erejét vizsgáltuk. A DPE+ fenotípus azonban a sejteredet szerinti Hans' főcsoportokkal, ezek molekuláris alcsoportjai között – döntő többségben – nem mutatott szignifikáns összefüggést. Alacsony szenzitivitása és specifitása miatt a pozitív prediktív értéke (PPV) olyan alacsony – kevesebb mint 0,30 – zónába esik, mely hatékony, legalább 95%-os konfidenciájú előszűrő alkalmazását nem teszi lehetővé. A DPE negatív prediktív értéke (NPV) viszont a két Hans' főcsoport összesen 6 molekuláris alcsoportjából 5-ben, belefoglalva a legfontosabb *MYC*-R, *BCL2*-R aberrációkat és kombinációikat, 1,00, azaz a DPE negatív fenotípus 100%-os megbízhatósággal előszűri a prognosztikus genetikai aberrációra negatív, iFISH-eljárással nem vizsgálandó, DLBCL mintákat. Ez az eredményünk nagyfokban megegyezik három másik tanulmányban a DPE-, illetve a *MYC* protein- fenotípus negatív prediktív értékére vonatkozó észleletekkel, annak ellenére, hogy az ezekben észlelt 34–41%-os DPE-pozitivitásnál tanulmányunkban jelentősen magasabb ezen fenotípus gyakorisága [13–15].

Vizsgálataink alapján nyert főbb következtetéseink:

1. Az izolált *IGH::MYC* a DLBCL Hans' főcsoportokra nem specifikus genotípus.
2. Az *IGH::BCL2*, izoláltan vagy kombinációban, GCB-szerű limfóma asszociált esemény.
3. A *BCL6*-R a nem GCB-szerű Hans' limfóma csoport molekuláris fémjele.
4. A *MYC*, *BCL2*, *BCL6* kópiaszám eltérések (nyerés, illetve amplifikáció) mindkét Hans' DLBCL csoportban előfordulnak.
5. A DPE-fenotípus 100%-os konfidenciával kizárja az *IGH::MYC*, valamint az *IGH::BCL2* és ezek kombinációit hordozó DLBCL genotípusokat.

Nyilatkozat: A közlemény más folyóiratban korábban nem jelent meg, és máshová nem került beküldésre. A levelező szerző elolvasta a szerzői útmutatót.

Anyagi támogatás/köszönetnyilvánítás: A kutatást az NVKP_16-1-2016-0005, az NRDI Hivatal, Magyarország TKP alap, az EFOP-3.6.1-16-2016-0004, TKP 2020/2020-4.1.1., GINOP-2.3.4-15-2020-00010, GINOP-2.3.1-20-2020-00001, BECOMING 2019-1-HU01-KA203-061251, a KA-2019-32, az ELIXIR Magyarország és az MTA PAB Klinikopathológiai Munkabizottsága támogatta.



Etikai Bizottsági engedély – Helsinki Deklaráció: PTE KK RIKEB, ETT TUKEB szakhatósági hozzájárulás alapján kiadott EGYÉI 50268-8/2017 sz. engedély. A dolgozat nem sérti a Helsinki Deklaráció (1975, revízió 2008) előírásait.

Szerzői munkamegosztás: VNI, PL, AH, GyA tervezte a projektet, KJ, HR, GB végezte a GEP és a bioinformatikai vizsgálatokat, RZs, BaA, AH analizálta a klinikai adatokat, HG, BT, CzJ, PA, ÖG, BE, LE, KN, BO, BoA, TL végezte a primer patológiai diagnosztikát, PL, KL végezte a patológiai konziliumi diagnosztikát, PL, PG értékelte az iFISH-vizsgálatokat, PL, GyA írta a kéziratot, KB, TT publikációs konzulensként működött közre. Valamennyi szerző olvasta és jóváhagyta a kéziratot.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

RÖVIDÍTÉSEK

ABC	aktivált B-sejt
ÁN	álnegatív
ÁP	álpozitív
COO	'cell-of-origin', sejteredet,
CNA	'copy number alteration', kópiaszám-változás
DH	'double hit', dupla aberráció
DLBCL	diffúz nagy B-sejtes limfóma
DPE	dupla protein expresszor
FFPE	formalinban fixált paraffinba ágyazott
F	fúzió
G/A	gain/amplification, nyeres/amplifikáció
GEP	génexpressziós profil
GCB	germinális centrum B-sejt
HGBL	magas malignitású B-sejtes limfóma
HSR	homogén festődésű régió
iFISH	interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció
IH	immunhisztológia
NGS	új generációs szekvenálás
NPV	negatív prediktív érték
PPV	pozitív prediktív érték
R	génátrendezés
TH	'triple hit', tripla aberráció
TPM	transzkriptum per millió
VN	valódi negatív
VP	valódi pozitív

IRODALOM

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–11.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937–47.
- Wright G, Tan B[†], Rosenwald A[†], et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9991–6.
- Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with Rituximab. *J Clin Oncol* 2011; 29: 200–7.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275–82.
- Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma, NOS. In: Swerdlow SH, editor. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France: International Agency of Research on Cancer; 2017, pp. 291–7.
- Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of Rituximab. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3360–5.
- Pedersen MØ[†], Gang AO[†], Pulsen TS, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur J Haematol* 2013; 92: 42–8.
- Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015; 126: 2466–74.
- Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2015; 7: 2401–16.
- Sesques P, Johnson NA. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Blood* 2017; 129: 280–8.
- Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology* 2018; 50: 74–87.
- Scott DW, King RL, Staiger A, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood* 2018; 131: 2060–4.
- Copie-Bergman C. Double-hit DLBCL: should we limit FISH testing? *Blood* 2018; 131: 1997–8.
- Timlin DM, O'Hare K, Walker J, et al. FISH studies in DLBCL: correlations with cell of origin: the Irish experience. *J Clin Pathol* 2018; 71: 946–7.
- McPhail ED, Maurer MJ, Macon WR, et al. Inferior survival in high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements is not associated with MYC/IG gene rearrangements. *Haematologica* 2018; 103: 1899–907.
- Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-hit gene expressions signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019; 37: 190–201.
- Pophali PA, Marinelli LM, Ketterling RP, et al. High level MYC amplification in B-cell lymphomas: is it a marker of aggressive disease? *Blood Cancer J* 2020; 10: 5. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0271-z>.
- Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B-cell lymphoma with therapeutic implications. *Cancer Cell* 2020; 37: 551–68.
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36: 1720–48.



- [21] Pajor G, Kajtár B, Pajor L, et al. State-of-the-art FISHing: automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. *Cytometry A* 2012; 81A: 649–63.
- [22] Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>.
- [23] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26: 139–40.
- [24] Law CW, Chen Y, Shi W, et al. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* 2014; 15: R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>.
- [25] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- [26] Yan WH, Jiang XN, Wang WG, et al. Cell-of-Origin subtyping of diffuse large B-cell lymphoma by using a qPCR-based gene expression assay on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Front Oncol* 2020; 10: 803. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00803>.
- [27] Campo E. Pathology and classification of aggressive mature B-cell lymphomas. *Hematol Oncol* 2017; 35: 80–3.
- [28] Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology* 2008; 53: 205–17.
- [29] Oberman EC, Csató M, Dirnhofer S, et al. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol* 2009; 62: 754–6.
- [30] Barran Sh, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of Rituximab. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3360–5.
- [31] Zhang YX, Wang H, Ren C, et al. Correlation between C-MYC, BCL-2 and BCL-6 protein expression and gene translocation as biomarkers in diagnosis and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Front Pharmacol* 2019; 9: 1–11.