

# A primer központi idegrendszeri lymphomák sejteredete, genomikai profilja és metabolikus vizsgálata

Doktori értekezés

**Dr. Marosvári Dóra**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Reiniger Lilla, Ph.D, egyetemi docens  
Dr. Bödör Csaba, Ph.D, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Gergely Lajos, Ph.D, egyetemi docens  
Félné Dr. Semsei Ágnes, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Mikala Gábor, Ph.D, klinikai főorvos  
Dr. Erdélyi Dániel, Ph.D, egyetemi docens

Budapest  
2020

## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
I. BEVEZETÉS .....	7
1. A központi idegrendszeri lymphomák .....	7
1.1. A primer központi idegrendszeri lymphomák .....	7
1.1.1. A primer központi idegrendszeri lymphomák előfordulása és etiológiája .	7
1.1.2. A primer központi idegrendszeri lymphomák klinikai képe és diagnózisa	8
1.1.3. A primer központi idegrendszeri lymphomák szövettani képe és immunfenotípusa .....	9
1.1.4. A primer központi idegrendszeri lymphomák prognózisa és kezelése .....	10
1.2. A szekunder központi idegrendszeri lymphoma.....	15
2. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák jellemzése.....	16
3. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák és a primer központi idegrendszeri lymphomák sejteredete .....	18
4. A primer központi idegrendszeri lymphomák genetikai háttere .....	27
5. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák és a primer központi idegrendszeri lymphomák metabolizmusa és energiaháztartása .....	33
5.1. Az mTOR útvonal bemutatása.....	33
III. MÓDSZEREK.....	41
1. RNS és DNS alapú vizsgálatok .....	41
1.1. Beteganyag .....	41
1.2. RNS alapú vizsgálatok .....	44
1.2.1. RNS izolálás .....	44
1.2.2. A sejteredet meghatározása NanoString LST-vel .....	45
1.3. DNS alapú vizsgálatok .....	47
1.3.1. DNS izolálás .....	47
1.3.2. Nagy érzékenységű, célzott, új-generációs újraszekvenálás és a bioinformatikai analízis .....	47
1.3.3. Validálás Sanger szekvenálással .....	49
2. Fehérje alapú vizsgálatok és sejttenyésztés .....	50
2.1. Anyagok.....	50
2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok .....	51
2.3. Sejttenyésztés és in vitro kezelések .....	53
2.4. A p-S6 expresszió mérése .....	53
2.4.1. Western blot .....	53

2.4.2. Flow cytometria.....	54
3. Statisztikai analízis .....	55
IV. EREDMÉNYEK.....	56
1. RNS alapú vizsgálatok .....	56
1.1. Sejteredet meghatározása NanoString LST assay-vel és immunhisztokémiával .....	56
2. DNS alapú vizsgálatok .....	60
2.1. Az NGS vizsgálat eredményei.....	60
3. A sejteredet és a mutációs profil összefüggéseinek vizsgálata a túléléssel .....	66
4. Fehérje alapú vizsgálatok .....	71
4.1. Az mTOR útvonal fehérjéinek expressziós vizsgálata .....	71
4.2. Az mTOR útvonal aktivitásának és a sejteredet összefüggésének vizsgálata .	73
4.3. Az mTOR független kinázok vizsgálata PCNSL-ben .....	74
4.4. A PASK expresszió vizsgálata PCNSL-ben és DLBCL-ben.....	74
V. MEGBESZÉLÉS.....	77
VI. KÖVETKEZTETÉSEK .....	84
VII. ÖSSZEFOGLALÁS .....	85
VIII. SUMMARY .....	86
IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	87
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	111
XI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS .....	114
XII. FÜGGELÉK .....	115

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>4-EB-P1:</b>	4E-kötő fehérje 1
<b>ABC:</b>	aktivált B-sejtes eredet
<b>AIDS:</b>	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
<b>AKT:</b>	„v-akt murine thymoma viral oncogene homolog”
<b>ASCT:</b>	autológ őssejt transzplantáció
<b>ASHM:</b>	aberráns szomatikus hipermutáció
<b>BCR:</b>	B-sejt receptor
<b>BTK:</b>	Burton tirozin kináz
<b>CLL:</b>	krónikus lymphocytás leukémia
<b>CNA:</b>	kópiaszám eltérés
<b>CR:</b>	komplett remisszió
<b>CSF:</b>	cerebrospinális folyadék
<b>DAB:</b>	3,3'-Diaminobenzidin
<b>DA-EPOCH:</b>	„dose-adjusted” etoposide, vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide és prednisone
<b>DA-TEDDI-R:</b>	„dose-adjusted” temozolomide, etoposide, doxorubicin, dexamethasone, ibrutinib, rituximab
<b>DEPTOR:</b>	„DEP domain-containing mTOR-interacting protein”
<b>DLBCL:</b>	diffúz nagy B-sejtes lymphoma
<b>DNS:</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>EBV:</b>	Epstein-Barr vírus
<b>ECOG:</b>	„Eastern Cooperative Oncology Group”
<b>EFS:</b>	eseménymentes túlélés
<b>EGF1/2/3:</b>	epidermális növekedési faktor 1/2/3
<b>ERK:</b>	„extracellular signal-regulated kinase”
<b>ETT TUKEB:</b>	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
<b>FDA:</b>	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Felügyelet
<b>FFPE:</b>	formalin-fixált paraffinba ágyazott

<b>FISH:</b>	fluorescens in situ hibridizáció
<b>FL:</b>	follikuláris lymphoma
<b>GCB:</b>	centrum germinatívum B-sejtes eredet
<b>GEP:</b>	génexpressziós profil
<b>HD-MTX:</b>	nagy dózisú metotrexát
<b>HER2:</b>	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
<b>HLA:</b>	humán leukocita antigén
<b>IGF:</b>	inzulinszerű növekedési faktor
<b>IELSG:</b>	„International Extranodal Lymphoma Study Group”
<b>IMDM:</b>	Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium
<b>IPI:</b>	nemzetközi prognosztikai index
<b>KIR:</b>	központi idegrendszer
<b>KPS:</b>	„Karnofsky Performance Status”
<b>LDH:</b>	laktát-dehidrogenáz
<b>LPS:</b>	„linear predictor score”
<b>LST:</b>	lymphoma subtyping test
<b>MCL:</b>	köpenysejtes lymphoma
<b>MFI:</b>	átlagos fluoreszcencia intenzitás
<b>mLST8:</b>	„mammalian lethal with SEC13 protein 8”
<b>MRI:</b>	mágneses rezonancia képalkotás
<b>mRNS:</b>	messenger ribonukleinsav
<b>mSin1:</b>	„mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1”
<b>mTOR:</b>	„mammalian target of rapamycin”
<b>mTORC1:</b>	mTOR- komplex 1
<b>mTORC2:</b>	mTOR- komplex 2
<b>NHL:</b>	non-Hodgkin lymphoma
<b>NGS:</b>	új-generációs szekvenálás
<b>non-GCB:</b>	nem centrum germinatívum B-sejtes eredet
<b>ORR:</b>	összválasz arány
<b>OS:</b>	teljes túlélés
<b>PASK:</b>	„PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase”
<b>PCNSL:</b>	primer központi idegrendszeri lymphoma

<b>PCR:</b>	polimeráz láncreakció
<b>PD1:</b>	programozott sejthalál fehérje 1
<b>PDGF:</b>	vérlemezke eredetű növekedési faktor
<b>PFS:</b>	progressziómentes túlélés
<b>PI3K:</b>	foszfatidil- inozitol 3 kináz
<b>PIP2:</b>	foszfatidil-inozitol-biszfoszfát
<b>PIP3:</b>	foszfatidil-inozitol-triszfoszfát
<b>PRAS40:</b>	„proline-rich AKT substrate of 40 kDa”
<b>R-CHOP:</b>	rituximab, cylophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednisone
<b>Raptor:</b>	„regulatory-associated protein of mTOR”
<b>Rheb:</b>	„Ras homolog enriched in brain”
<b>Rictor:</b>	„Rapamycin insensitive companion of mTOR”
<b>RSK:</b>	p90 riboszomális S6 kináz
<b>S6K1:</b>	p70 riboszomális S6 kináz 1
<b>SCNSL:</b>	szekunder központi idegrendszeri lymphoma
<b>SNP:</b>	egy nukleotid polimorfizmus
<b>TLR:</b>	Toll-like receptor
<b>TSC1/2:</b>	„Tuberous Sclerosis Complex1/2”
<b>VAF:</b>	variáns allél frekvencia
<b>VEGF:</b>	vaszkuláris növekedési faktor
<b>WBRT:</b>	teljes agy besugárzás
<b>WES:</b>	teljes exom szekvenálás
<b>WGS:</b>	teljes genom szekvenálás
<b>WHO:</b>	Egészségügyi Világszervezet

## I. BEVEZETÉS

### 1. A központi idegrendszeri lymphomák

A központi idegrendszerben (KIR) megjelenő lymphomák kialakulhatnak elsődlegesen az idegrendszerben, ezeket primer központi idegrendszeri lymphomáknak (PCNSL) nevezzük, melyek szövettanilag döntően (>95%) diffúz nagy B-sejtes lymphomák (DLBCL). Emellett a KIR lymphomák lehetnek különböző extracerebrális lymphomák agyi manifesztációi, amelyeket szekunder központi idegrendszeri lymphomáknak (SCNSL) nevezünk.

#### 1.1. A primer központi idegrendszeri lymphomák

A primer központi idegrendszeri lymphomák olyan ritka, extranodális non-Hodgkin lymphomák (NHL), melyek a diagnózis idején csak az agyvelőt, a szemet, a gerincvelőt és a látgy agyhártyát érintik. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) meghatározása szerint PCNSL esetén a szisztémás érintettség kizárható, továbbá nem tartoznak a definícióba a kemény agyhártyát érintő lymphomák, az intravasculáris nagy B-sejtes lymphoma és az immundeficienciához kötődő lymphomák sem. A dolgozatban a PCNSL kifejezés használata a primer központi idegrendszeri diffúz nagy B-sejtes lymphomákat jelöli. A PCNSL már a 2008-as WHO lymphoma osztályozásban is külön entitásként szerepelt [1], ami a 2017-es reklasszifikációban sem változott, magába foglalva a primer intracerebrális és a primer intraocularis lymphomákat [2].

##### 1.1.1. A primer központi idegrendszeri lymphomák előfordulása és etiológiája

A frissen diagnosztizált KIR daganatok mintegy 3-4%-a, míg a NHL-k 1%-a primer központi idegrendszeri lymphoma [3]. A betegség incidenciája 0,47/100 000 lakos, mely az életkor előrehaladtával nő. A férfi: nő arány 3:2, a diagnóziskor a medián életkor 66 év [2, 4].

Már több mint húsz éve ismert, hogy a veleszületett vagy szerzett immunhiányos állapotokban nagyobb az agyi lymphomák kialakulásának esélye, és azt is tudjuk, hogy

immunszupprimált betegekben különböző vírusok, pl. az Epstein-Barr vírus (EBV), fontos szerepet játszanak az agyi lymphomák pathogenezisében [5-8]. Ezzel ellentétben az immunkompetens betegekben az EBV-nek nincs kóroki szerepe a PCNSL kialakulásában, és más etiológiai tényezők sem ismertek [2, 9].

### **1.1.2. A primer központi idegrendszeri lymphomák klinikai képe és diagnózisa**

A betegség klinikai megjelenése változatos, függ attól, hogy az agy mely területén lokalizálódik az elváltozás, gyakran figyelhető meg kognitív hanyatlás, személyiségváltozás, neurológiai góctünetek és az intracraniális nyomásfokozódás tünetei. Oculáris érintettség esetén a betegek látásromlásra és úszó homályokra panaszkodnak. Ugyanakkor az esetek felében szemészeti panaszt nem okoz a betegség [10].

Az agyi lymphomák 60%-ban supratentoriális elhelyezkedésűek, leggyakrabban az agyféltekék (38%), a bazális ganglionok, a thalamus (16%), és a corpus callosum (14%) érintettek. Az immunkompetens betegekben 20-40%-ban vannak jelen multiplex léziók [11], az extracerebrális disszemináció igen ritka [2].

A képalkotó eljárások közül a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) a legalkalmasabb az elváltozás helyének, és kiterjedésének megítélésében. Ugyanakkor, az MRI vizsgálattal talált eltérések nem mindig specifikusak, ezért a legfontosabb a sztereotaxiás biopsziás mintavétel elvégzése, és a szövettani diagnózis (lásd 1.1.3. fejezet). A biopsziát, amennyiben lehetséges, célszerű a szteroidterápia megkezdése előtt elvégezni, hiszen a kezelés hatására igen rövid idő alatt a tumor méretének csökkenése, akár eltűnése figyelhető meg, ami megnehezíti, vagy akár lehetetlenné teheti a pontos diagnózis felállítását [10]. A cerebrospinális folyadék (CSF) citológiai vizsgálata során 2-30%-ban detektálhatók lymphoma sejtek [12, 13], de a citológiával negatív esetekben az áramlás cytometriai vizsgálat és az immunglobulin nehéz és könnyűláncok klonalitás vizsgálata segítheti a malignus sejtek elkülönítését a reaktív lymphocytáktól [13, 14]. Az utóbbi években számos CSF-ből kimutatható potenciális biomarkert írtak le, melyek elősegíthetik a diagnózis felállítását, például különböző mikroRNS-ek (miR21, miR19b, miR363, miR92) [15], a szolubilis CD19 [16], az antithrombin III [17], szabad immunglobulin könnyű láncok [14], az interleukin-10 és a CXCL13 [18]. Azonban ezek a biomarkerek napjainkban még nem képezik a rutin



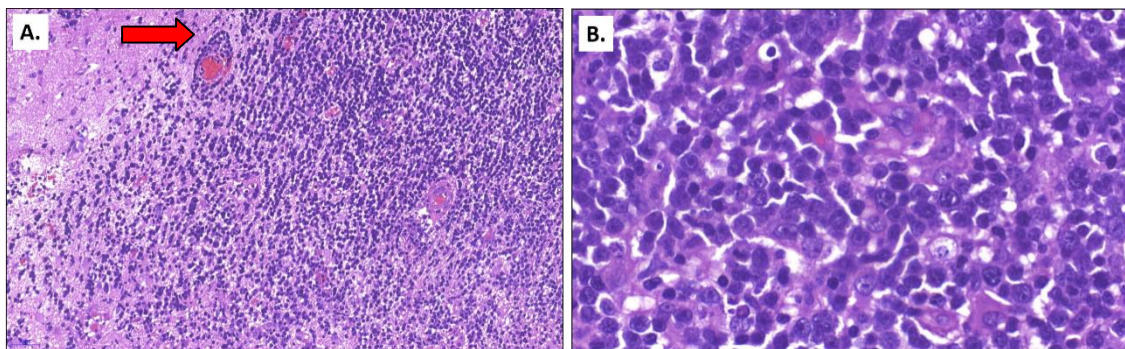
diagnosztikai algoritmusok részét.

A betegség kiterjedésének pontos megítéléséhez szükséges a CSF citológiai vizsgálata, mindkét szem réslámpás vizsgálata, és a gerinc MRI felvétele, ezenfelül a szisztémás érintettség kizárásához a mellkas, a hasüreg és a kismedence képalkotó vizsgálata. A diagnóziskor PCNSL-nek véleményezett eltérések akár 8%-ában a további vizsgálatok során kiderülhet, hogy valójában szisztémás DLBCL agyi manifesztációjával, azaz szekunder központi idegrendszeri lymphomával állunk szemben [19].

### 1.1.3. A primer központi idegrendszeri lymphomák szövettani képe és immunfenotípusa

Az intraparenchymális lymphomák általában diffúz növekedési mintázatot mutatnak. A tumorsejtek leginkább perivasculárisan, gyűrűszerűen helyezkednek el, ami legjobban a tumor széli részén figyelhető meg. A tumorsejtek döntően centroblastokra emlékeztetnek, körülöttük reaktív T- és B-sejtek, makrofágok, aktivált mikroglia sejtek és reaktív astrocyták lehetnek (1. ábra).

A frissen felfedezett intracraniális elváltozások esetén gyakran nagy dózisu szteroiddal kezdik a kezelést a tünetek enyhítése érdekében. Azonban PCNSL esetén szteroidkezelés hatására kiterjedt nekrozis jelenhet meg a tumor területén, amely a betegek akár 40-50%-ában lehetetlenné teszi a diagnózist [2].



**1. ábra.** A PCNSL szövettani megjelenése. A diffúz növekedési mintázatot mutató, sokszor perivasculárisan (piros nyíl) elhelyezkedő (A. ábra, hematoxilin-eozin festés, 200x nagyítás) tumorsejtek döntően centroblastokra emlékeztetnek (B. ábra, hematoxilin-eozin festés, 600x nagyítás).

A PCNSL tumorsejtjei érett B-sejtek, melyekre a PAX5, CD19, CD20, CD22 és CD79a expresszió jellemző. Az IRF4/MUM1 expresszió az esetek közel 90%-ában, BCL6 expresszió 60-80%-ában figyelhető meg, tehát a PCNSL esetek jelentős részére az aktivált B-sejtes (ABC) fenotípus jellemző, amiről részletesen a 3. fejezetben írunk. A központi idegrendszeri lymphomák kevesebb, mint 10%-a expresszálja a CD10 molekulát, ami főleg a szisztémás DLBCL-re jellemző, ezért a CD10 pozitivitás fel kell, hogy vesse extracerebrális DLBCL agyi manifesztációjának a lehetőségét. Gyakori a BCL2 expresszió, azonban ez nem mutat összefüggést a t(14;18)(q32;q21) transzlokációval [2, 20]. Az esetek mintegy 82%-a fokozott BCL2, erős MYC expressziót mutat. Jellemző a nagyfokú mitotikus aktivitás, a Ki67 proliferációs index általában >70%, de akár 90%-nál magasabb is lehet. A PCNSL esetek majdnem felében a HLA I és II osztály expressziójának hiánya is megfigyelhető [2].

#### **1.1.4. A primer központi idegrendszeri lymphomák prognózisa és kezelése**

A PCNSL rizikóbecsléséhez két prognosztikai osztályozás áll rendelkezésünkre. Az International Extranodal Lymphoma Study Group” (IELSG) 378 immunkompetens PCNSL beteggel végzett retrospektív vizsgálata során meghatározott öt független prognosztikus faktort, melyek a kor, az ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) státusz, a szérum laktát dehidrogenáz (LDH) szint, a CSF fehérje koncentrációja és a mélyebb agyi struktúrák érintettsége. Ezek alapján a várható két éves teljes túlélést (OS) becsülték meg, az 1. táblázatban foglaltak szerint [21]. A másik prognosztikai osztályozás a Memorial Sloan-Kettering Cancer Center modellje, ami a kort és a Karnofsky státuszt (KPS) veszi figyelembe, a 2. táblázatban bemutatottaknak megfelelően [22].

**1. táblázat.** Az International Extranodal Lymphoma Study Group prognosztikai rendszere [21]

<b>Prognosztikai faktor</b>	<b>Kedvező tulajdonság (0 pont)</b>	<b>Kedvezőtlen tulajdonság (1 pont)</b>
<b>Életkor</b>	<60 év	> 60 év
<b>ECOG PS</b>	0-1	>1
<b>Szérum LDH szint</b>	Normál	Emelkedett
<b>CSF fehérje koncentráció</b>	Normál	Emelkedett
<b>Mélyebb agyi struktúrák érintettsége</b>	Nem	Igen
	<b>Pontok</b>	<b>2 éves OS (%)</b>
	0-1	80
	2-3	48
	4-5	15

*Rövidítések: CSF: cerebro spinal fluid; ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance status; LDH: laktát dehidrogenáz; OS: teljes túlélés.*

**2. táblázat.** A Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognosztikai rendszere [22]

<b>Osztály</b>	<b>Medián OS (év)</b>	<b>Medián kudarcmentes túlélés (év)</b>
1 (kor ≤ 50 év)	8,5	2,0
2 (kor > 50 év + KPS ≥ 70)	3,2	1,8
3 (kor > 50 év + KPS (<70))	1,1	0,6

*Rövidítések: KPS: Karnofsky performance status; OS: teljes túlélés.*

Az utóbbi években intenzív kutatások folytak a PCNSL molekuláris hátterének megismerése érdekében. Annak ellenére, hogy egyre bővültek az ismereteink a PCNSL pathogeneziséről, a betegség kezeléséről a mai napig nincs konszenzus. Összességében a frissen felfedezett PCNSL-ben szenvedő betegek kezelése kemoterápiás indukcióval kezdődik, melynek a célja a komplett radiológiai válasz (CR) elérése. Ezt követi a konszolidációs terápia, ami a reziduális betegség eliminálását, a hosszabb remissziót és a túlélés növelését célozza [23].

Az 1980-as évek elején a PCNSL első választandó kezelése a teljes agy besugárzás (WBRT) volt. Az agyi lymphomák sugárérzékenysége miatt, a WBRT-vel jó korai választ értek el, az összválaszarány (ORR) 50% volt, ugyanakkor a kezelést követően a betegek hamar relabáltak, a medián OS mindössze 10-18 hónapnak adódott. Emellett főleg az idősebb betegekben gyakran figyeltek meg késői neurotoxicitást [10]. Ezen szempontok miatt, a frissen diagnosztizált PCNSL kezelésében önmagában a WBRT már nem szerepel [23].

Az WBRT-t háttérbe szorította a nagy dóziszú ( $3,5-8 \text{ g/m}^2$ ) metotrexát (HD-MTX) indukciós kezelés. A HD-MTX monoterápia esetén a medián progressziómentes túlélés (PFS) 12,8 hónap, míg az OS 55 hónap [24]. Még kedvezőbb eredmények érhetőek el kombinációs kezelésekkel. Számos gyógyszert próbáltak már kombinálni MTX-tal különböző klinikai vizsgálatokban, pl. a temozolomidot, a rituximabot, a cytarabint, a thiotepát, a vincristint, az etoposidot, és a procarbazinet [25-27]. Egy multicentrikus fázis II-es vizsgálatban a HD-MTX és a cytarabin kombinációjával javult a CR (46% vs. 18%), a 3 éves PFS (38% vs. 21%) és a 3 éves OS (46% vs. 32%), a HD-MTX monoterápiához képest [26]. Egy frissebb randomizált fázis II-es vizsgálatban a HD-MTX-cytarabin kombináció hatékonyságát hasonlították össze a HD-MTX-cytarabin-thiotepa-rituximab, úgynevezett MATRix protokoll, négyes kombinációval. A MATRix protokoll alkalmazásával mind a CR (49% vs. 23%), a 2 éves PFS (61% vs. 36%) és a 2 éves OS (69% vs. 42%) is javulást mutatott [25].

Az indukciós kezelést követő konszolidáló kezelésként szóba jön a WBRT, és az autológ őssejt transzplantáció (ASCT) [27, 28]. Az ASCT főként fiatalabb (<60 év), jó általános állapotú betegek esetén javasolt, alkalmazása során ritkábban figyelhető meg a késői neurotoxicitás [23, 29].

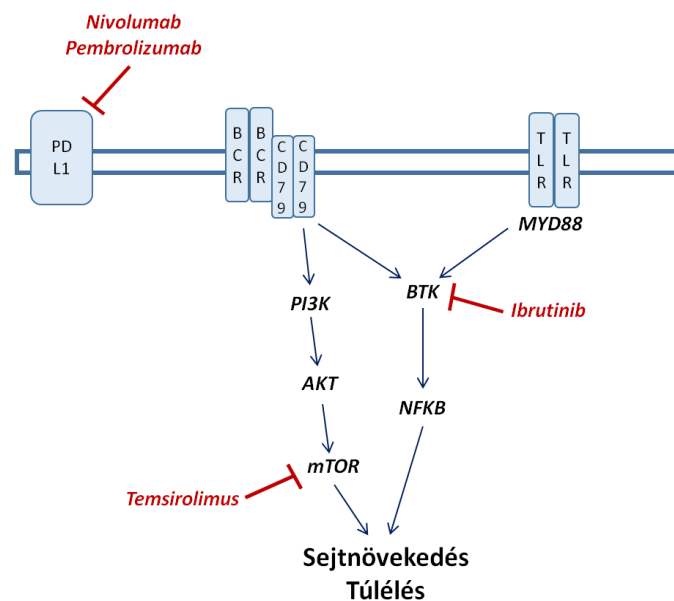
Az utóbbi években a terápiás modalitások fejlődésének köszönhetően jelentősen

javult a PCNSL betegek túlélése, míg a 70-es években az 50 év alatti betegek medián összetúlélése 35,5 hónap volt, addig a 2000-es évekre ez 134 hónapra nőtt. Szintén javult ebben az időszakban az 50-69 év közötti betegek túlélése (medián OS 8 hónap vs. 25 hónap), azonban a 70 év feletti betegek túlélése nem változott az elmúlt négy évtizedben [30]. Ezen terápiás sikerek ellenére a túlélés még mindig nem éri el a rituximabbal kezelt, komplett remissziót elérő szisztémás DLBCL-ben szenvedő betegek túlélését (medián OS 15 év) [31].

Tekintve, hogy a PCNSL kezelése még napjainkban is jelentős kihívás, számos klinikai vizsgálat folyik új, célzott terápiák bevezetésére. Az elmúlt évek során különböző klinikai vizsgálatokba vonták be, többek között az immunellenőrzőpont gátló pembrolizumabot és nivolumabot, az immunmoduláló lenalidomidot, a Bruton tirozin kináz gátló ibrutinibet, az mTOR gátlószer temsirolimust, és a folsav antimetabolit pemetrexedet (2. ábra).

Az utóbbi években az immunonkológia ugrásszerű fejlődését figyelhettük meg. Az ún. immun-checkpoint gátlás mára valós terápiás lehetőség számos malignitás esetén. A programozott sejthalál 1 fehérje (PD-1) gátlószereket az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal (FDA) engedélyezte 2014-ben előrehaladott melanoma, majd 2015-ben áttétes, a platina alapú kemoterápiára rezisztens nem kissejtes tüdő daganatok kezelésére is [32]. Klinikai vizsgálatban a PD-1 gátló nivolumabot 4 relabált/refrakter PCNSL-es beteg kapta, a terápia során minden betegnél megfigyeltek radiológiai választ, és a PFS 14-17 hónap volt [33]. Jelenleg is folynak további fázis II vizsgálatok a PD-1 gátló nivolumabbal és pembrolizumabbal (NCT02857426 és NCT02779101) PCNSL-ben. Egy másik ígéretes szer az antiproliferatív aktivitású lenalidomide, amely hatására egy fázis I vizsgálatban (NCT01542918) 13 beteg közül 8-nál figyeltek meg radiológiai választ, akik közül 4 beteg volt CR-ben több mint 9 hónapig, és 2 beteg maradt majdnem 2 évig remisszóban [34]. Egy fázis I vizsgálatban 20 központi idegrendszeri lymphomás (13 PCNSL, 7 SCNSL) beteg részült az irreverzibilis Bruton tirozin kináz (BTK) gátló ibrutinib monoterápiában. A PCNSL betegek 77%-ában figyeltek meg klinikai választ, és 5 betegnél érték el CR-t. A medián PFS 4,5 hónap, míg az OS 15 hónap volt [35]. Egy másik fázis I vizsgálatban az ibrutinibet először két hétig monoterápiában, amely során a 18 beteg 94%-ának volt radiológiai válasza. Ezt követően az ibrutinibet kiegészítették

temozolomiddal, etoposiddal, doxorubicinnal, dexamethasonnal és rituximabbal (DA-TEDDI-R). A vizsgálatban 13 relabált/refrakter PCNSL beteg és 5 korábban még kezelésben nem részesült beteg vett részt. A 13 relabált/refrakter beteg esetén a medián PFS 15,3 hónap volt és 1 év alatt a medián OS-t nem érték el, a betegek 51,3%-a volt életben [36]. Az mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor temsirolimus hatását egy fázis II vizsgálatban tanulmányozták, ahol az ORR 54% volt. A relatíve magas válaszarány alapján feltételezték, hogy az mTOR útvonalnak szerepe lehet a PCNSL pathogenezisében, azonban a medián PFS és OS igen rövid, csupán 2,1 hónap és 3,7 hónap volt, melynek hátterében akár gyógyszer rezisztencia kialakulása is állhat [37]. A metotrexáthoz hasonló, folsav antimetabolit hatású pemetrexed alkalmazása esetén egy vizsgálatban, relabált betegekben, a radiológiai válaszarány 58,8% volt, míg a medián túlélés 7,8 hónap [38]. Emellett idős betegek kezdeti terápiájaként is megfelelőnek bizonyult, a betegek a gyógyszert jól tolerálták, és a medián OS 19,5 hónap volt. A vizsgálat során neurotoxicitás, vagy kezeléshez köthető halálozás nem volt [39]. A HD-MTX alapú kezdeti terápiát követően, relabált betegek esetében is hatásos volt a pemetrexed-rituximab kombináció egy klinikai vizsgálatban [40].



**2. ábra.** A PCNSL kezelésében alkalmazott új, célzott terápiás szerek és az általuk gátolt útvonalak. Rövidítések: BCR: B-sejt receptor; TLR: Toll- like receptor; PDL1: programozott sejthalál ligand 1.

A fenti eredmények jelzik, hogy a különböző célzott terápiák alkalmazásával sem történt terápiás áttörés a betegség kezelésében. A PCNSL pontos molekuláris hátterének megismerésével esély mutatkozna a személyre szabott terápia bevezetésére, mely ebben a ritka és agresszív lymphomában szenvedő betegek túlélését és életminőségét jelentősen javíthatná [23].

## **1.2. A szekunder központi idegrendszeri lymphoma**

Gyakorlatilag bármely nodális vagy extranodális lymphomának lehet másodlagos agyi manifesztációja, azonban az egyes lymphoma entitások esetében eltérő gyakorisággal. Míg az indolens lymphomák, például a folliculáris lymphoma (FL) vagy a köpenysejtes lymphoma (MCL) esetén ritkán alakul ki [41], addig a központi idegrendszeri profilaxisban nem részesülő agresszív lymphomában szenvedő betegek 5%-ában figyelhető meg [42]. Burkitt lymphomában és lymphoblastos lymphomában idegrendszeri érintettség akár az esetek 5-10%-ában is kialakulhat [43, 44]. A szisztémás diffúz nagy B-sejtes lymphomák agyi manifesztációja a betegség diagnosztikájánál igen ritka, az incidenciája 1% körüli. Azonban a kezelést követően relabáló betegek egy részénél már megfigyelhető a központi idegrendszeri érintettség is. A DLBCL-ek relapszusa általában a diagnosztikától számított első 2 évben következik be, míg a KIR manifesztáció kialakulásához kevesebb, mint medián 1 év szükséges. A KIR érintettsége esetén a medián OS mindössze 2-5 hónap. Az idegrendszeri manifesztáció profilaxisára intratekális vagy intravénás metotrexát alkalmazható, azonban ezt a megelőző kezelést csak a magas rizikójú betegek esetében alkalmazzák [45].

## 2. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák jellemzése

A DLBCL közepes vagy nagyméretű B-lymphocyták neopláziája, melyre diffúz növekedési mintázat jellemző. A fejlett országokban a DLBCL-ek a NHL-k 25-30%-át teszik ki, míg a fejlődő országokban ennél is nagyobb a prevalenciája. Döntően az időskor betegsége, a medián életkor 70 év felett van, azonban gyerekekben és fiatalokban is előfordulhat.

A betegség etiológiája nem ismert, általában de novo jelenik meg, azonban kevésbé agresszív lymphomák pl. krónikus lymphocytás leukémia (CLL), folliculáris lymphoma, vagy köpenysejtes lymphoma transzformációja során is kialakulhat ún. szekunder DLBCL formájában. Az immunuszupprimált betegek gyakrabban érintettek, ezekben az esetekben az EBV-nek fontos szerepe van a kórkép pathogenezisében. Az immunkompetens betegekben EBV infekció mindössze 3-10%-ban figyelhető meg.

A DLBCL lehet nodális (60%) vagy extranodális (40%) lokalizációjú. A leggyakoribb extranodális lokalizáció a gasztrointesztinális traktus (gyomor és ileocecalis régió), ezen kívül megjelenhetnek a csontokban, a herékben, a lépben, a Waldeyer gyűrűben, a nyálmirigyekben, a pajzsmirigyben, májban, vesékben vagy akár a mellékvesékben. A veséket vagy a mellékveséket érintő esetekben gyakrabban figyelhető meg másodlagos agyi manifesztáció. A betegek rendszerint tünetmentesek, de B tünetek jelentkezhetnek. A klinikai megjelenését általában rapidan növekvő tumormassza jellemzi, a tünetek függenek a lymphoma lokalizációjától. Szövettani vizsgálattal DLBCL-ben a közepes, vagy nagyméretű lymphoid sejtek diffúz proliferációja figyelhető meg. Három gyakori morfológiai variáns ismert: a DLBCL centroblastos, immunoblastos és anaplasztikus megjelenésű lehet. Ezen kívül számos ritka morfológiai variáns is ismert [2].

A neoplasztikus sejtek általában pan B-sejt markereket (CD19, CD20, CD22, CD79a és PAX5) hordoznak, de egyes markerek vesztése is megfigyelhető. Felszíni vagy cytoplazmatikus immunglobulin az esetek 50-75%-ában detektálható. A CD10, a BCL6, a MUM1, FOXP1, GCET1 és LMO2 expresszió alapján centrum germinatívum (GC) és nem centrum germinatívum eredetű szubtypust különböztethetünk meg, melyről részletesebben a 3. fejezetben írunk. Emellett magas Ki67 proliferációs index jellemző,



amely általában több mint 40%, azonban egyes esetekben akár 90%-nál magasabb is lehet [2].

A DLBCL esetek több mint 50%-ában aberráns szomatikus hipermutáció (ASHM) érinti a *PIMI1*, a *MYC*, a *Rho/TTF* és a *PAX5* géneket [46]. Az új-generációs szekvenálás (NGS) megjelenésével a DLBCL mutációanalízise is az érdeklődés központjába került. A vizsgálatok során számos jelátviteli útvonal génjeiben azonosítottak visszatérő, driver mutációkat, például a tumorszupresszor, *TP53*; a kromatin modifikálásban résztvevő, (*ARID1A*, *MEF2B*, *MLL2*, *CREBBP* és *EP300*); a BCR, a Toll-like receptor (TLR) és az NF- $\kappa$ B útvonal, (*CD79B*, *MYD88*, *CARD11* és *TNFAIP3*), a RAS útvonal, (*KRAS*, *BRAF*; *NOTCH2*), a WNT jelút (*WIF1*), és a PI3K útvonal (*PIK3CD*, *PIK3R1*, *MTOR*) génjeiben [47-51].

A várható lefolyás becslésére a különböző klinikai paramétereket vizsgáló Nemzetközi Prognosztikus Index (IPI) alkalmas [2]. Napjainkban a DLBCL elsővonalbeli kezelésére az úgynevezett R-CHOP protokoll választandó, amely négy gyógyszer kombinációjából áll (CHOP- cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, és prednison), amelyet kiegészítenek egy CD20 elleni monoklonális antitesttel, a rituximabbal. Ezzel a kombinált kemo-immunoterápiával igen jó eredményeket értek el DLBCL-ben, az ORR 89%, az 5 éves PFS 72% és az 5 éves OS 80% [52].

### **3. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák és a primer központi idegrendszeri lymphomák sejteredete**

A 2000-es évek elején sikerült azonosítani a DLBCL-ek klinikai heterogenitásának hátterében álló molekuláris mechanizmusokat. Alizadeh és munkatársai messenger ribodezoxiribonukleinsav (mRNS) mikroarray segítségével meghatározták a DLBCL génexpressziós mintázatát (GEP), és ezek alapján két eltérő szubtypust különböztettek meg. Az egyik típus a centrum germinatívum B-sejtjeire jellemző expressziós mintázatot hordozta, ezeket GC B-sejt szerű DLBCL-nek (GCB) nevezzük. A másik csoportban a GC-érésen átesett, plazmablastos differenciáció irányába elkötelezett aktivált B-sejtekre jellemző expresszió volt megfigyelhető, melyet ABC szerű DLBCL-nek (ABC) hívunk. A GCB típusú DLBCL esetén szignifikánsan jobb túlélés volt megfigyelhető, mint az ABC típus esetén. Habár az átlagos öt éves túlélés az összes beteg esetén 52% volt, a GCB fenotípusú betegek 76%-a volt életben öt év után, míg ABC fenotípus esetén ez csupán 16% volt. [53]. Később további vizsgálatok is kedvezőbb túlélést írtak le GCB fenotípus esetén [54, 55].

Ezen eredmények alapján látható, hogy a prognózis szempontjából fontos a sejteredet meghatározása DLBCL-ben. Azonban a mikroarray technika nehezen elérhetőnek és költségesnek bizonyult, így az elkövetkező években számos immunhisztokémiai (IHC) algoritmust dolgoztak ki különböző munkacsoportok a sejteredet egyszerűbb és olcsóbb meghatározásához [56-61].

Elsőként Hans és munkatársai mutattak be egy IHC algoritmust 2004-ben, mely során a CD10, a BCL6 és a MUM1 fehérjék expresszióját vizsgálták DLBCL-ben (3A. ábra). A Hans algoritmus segítségével a rutin diagnosztikában is meghatározhatóvá váltak a prognosztikai szempontból fontos szubtipusok [61] Muris és munkatársai a CD10 és a MUM1 fehérjék expressziójának meghatározása mellett, az apoptózis reguláló BCL2 fehérje expressziója alapján határozták meg a sejteredetet (3B. ábra) [56]. A LMO2 fehérjét a normál centrum germinatívum sejtei és számos GCB eredetű lymphoma tumorsejtjei expresszálják [62]. Natkunam és munkatársai úgy találták, hogy kizárólag ezen fehérje expressziójának vizsgálatával meghatározható a GCB fenotípus, és a LMO2 fehérje expressziója kedvező prognózissal jár együtt (3C. ábra) [57].

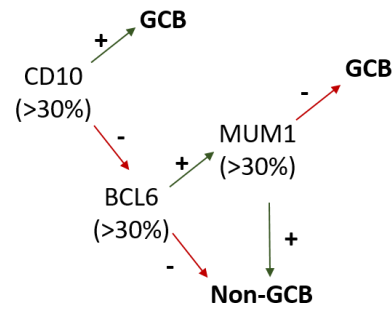
A sejteredet meghatározását Nyman és munkacsoportja az ABC specifikus

MUM1 és FOXP1 fehérjék expressziójának vizsgálatával végezték (3D. ábra) [58]. Az évek során számos olyan molekulát azonosítottak, melyek specifikusak a centrum germinatívum B-sejtjeire, ezért Choi és munkatársai 2009-ben kidolgoztak egy új algoritmust, amellyel pontosabban határozható meg a GCB/ABC szubtípus. A GCET1, a CD10, a BCL6, a MUM1, és a FOXP1 fehérjék expressziójának vizsgálatával közel 93%-os egyezés volt megfigyelhető a mikroarray vizsgálatokkal összevetve (3E. ábra) [60].

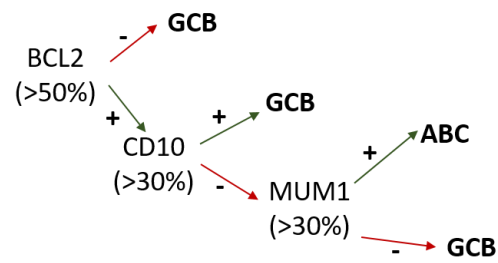
Átfogó tanulmányukban Meyer és munkatársai 2011-ben összehasonlították a korábban ismertetett IHC algoritmusokat, a módosított Hans (3F. ábra) és a Choi algoritmusokat (3G. ábra), emellett kidolgoztak egy újabb immunhisztokémiai módszert, az úgynevezett Tally algoritmust. A Tally algoritmus a GCB specifikus CD10 és GCET1 antigéneket, és az ABC specifikus MUM1 és FOXP1 antigéneket vizsgálja (3H. ábra). A kiértékelés során minden pozitív festődésre ad egy pontot, majd a fenotípus specifikus antigének pontszáma alapján határozza meg a szubtípust. Ha a GCB és az ABC specifikus antigének pontszáma egyenlő, akkor vizsgálják az LMO2 antigént: ha a tumorsejtek több mint 30%-ában pozitív, akkor GCB a szubtípus, míg ha kevebb mint 30%, akkor ABC a fenotípus. A különböző IHC algoritmusokkal meghatározott fenotípust összevetették a GEP módszerrel azonosítottal. Megállapították, hogy a Tally algoritmus eredményei egyeznek meg a legjobban a GEP vizsgálatok eredményeivel (93%). Bár a speciális ellenanyagok hozzáférhetőek, a legtöbb immunhisztokémiai laboratórium a rutin diagnosztikában nem használja azokat [63].

Visco és munkatársai leírták a CD10, FOXP1, és BCL6 fehérjék expresszióját vizsgáló algoritmusukat (3I. ábra), mely 92,6%-os konkordanciát mutat a GEP vizsgálat eredményeivel. ami a legmagasabb egyezés a többi IHC algoritmussal összehasonlítva [59].

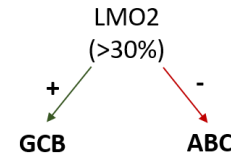
**A.** Hans algoritmus



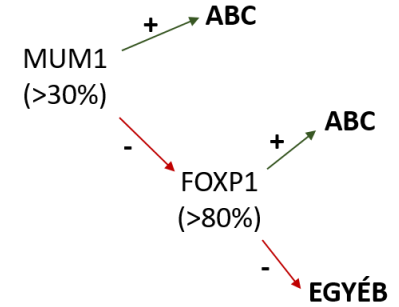
**B.** Muris algoritmus



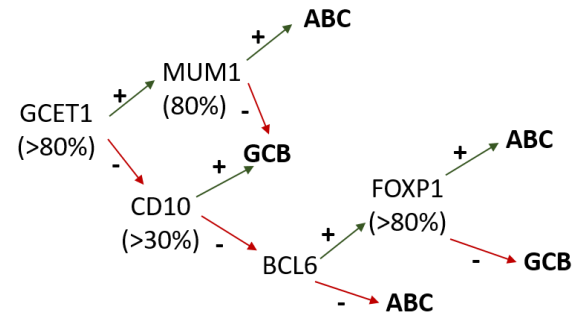
**C.** Natkunam algoritmus



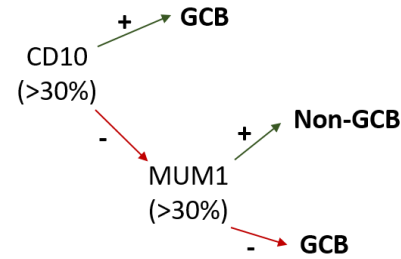
**D.** Nyman algoritmus



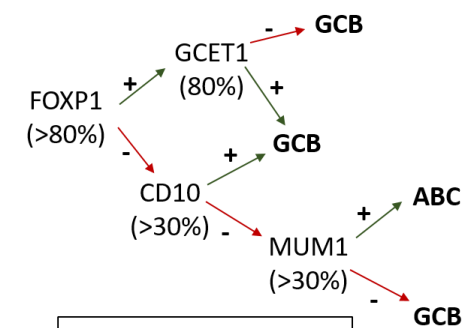
**E.** Choi algoritmus



**F.** Módosított Hans algoritmus



**G.** Módosított Choi algoritmus



**H.** Tally algoritmus

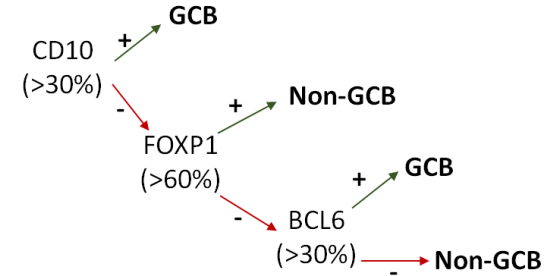
+ = 1 pont - = 0 pont

GCB	ABC
CD10 (>30%)	MUM1 (>30%)
GCET1 (>80%)	FOXP1 (>80%)
Pont (0-2)	Pont (0-2)

Pontok  
GCB > ABC  
ABC > GCB

Ha a GCB pont = ABC pont  
LMO2 ≥ 30% → GCB  
LMO2 < 30% → ABC

**I.** Visco-Young algoritmus



**3. ábra.** A sejteredet meghatározáshoz használt kilenc leggyakoribb immunhisztikémiai algoritmus összefoglalása: Hans (A), Muris (B), Natkunam (C), Nyman (D), Choi (E), módosított Hans (F), módosított Choi (G), Tally (H) és Visco (I). Minden algoritmus során több fehérje expresszióját vizsgálják, majd a GCB vagy ABC specifikus fehérjék expressziójából lehet a sejteredetet meghatározni. *Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet.*

Látható, hogy a különböző IHC algoritmusok nem egységesen használják az ABC, non-GCB nomenklatúrát, sőt az irodalomban sincs konszenzus ezzel kapcsolatban. A dolgozatban általánosságban a centrum germinatívum B-sejtes eredet esetén GCB jelölést használjuk a fenotípus meghatározása akár IHC módszerrel, akár génexpresszió vizsgálatával történt. Ezzel szemben ABC jelölést használunk, amikor a sejteredet génexpressziós vizsgálattal lett meghatározva, míg IHC algoritmus esetén a fenotípust non-GCB-nek definiáljuk.

Coutinho és munkacsoportja összehasonlították a fent ismertetett kilenc IHC algoritmust, mely során a különböző módszerekkel meghatározott sejteredet alacsony konkordanciát mutatott. Az összes módszer csupán az esetek 4,1%-át sorolta az GCB fenotípusba, míg non-GCB fenotípusúnak az esetek 21%-a adódott. A különböző algoritmusokat páronként összevetve azt találták, hogy a legrosszabb egyezést a többivel a Natkunam algoritmus mutatta. A legerősebb egyezést a Choi és a Visco módszerekkel kapott eredmények mutatták. A Hans és a módosított Hans algoritmusokkal volt a legmagasabb konkordancia elérhető a többi módszerrel (4. ábra) [64].

$\kappa$	Hans	Hans*	Nyman	Choi	Choi*	Natkunam	Tally	Muris	Visco
Hans		Good	Poor	Good	Moderate	Poor	Moderate	Moderate	Good
Hans*	Good		Moderate	Moderate	Good	Poor	Moderate	Good	Moderate
Nyman	Poor	Moderate		Poor	Moderate	Poor	Moderate	Moderate	Poor
Choi	Good	Moderate	Poor		Moderate	Poor	Moderate	Moderate	Very good
Choi*	Moderate	Good	Moderate	Moderate		Moderate	Good	Moderate	Moderate
Natkunam	Poor	Poor	Poor	Poor	Moderate		Moderate	Moderate	Moderate
Tally	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Good	Moderate		Moderate	Moderate
Muris	Moderate	Good	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate		Moderate
Visco	Good	Moderate	Poor	Very good	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	

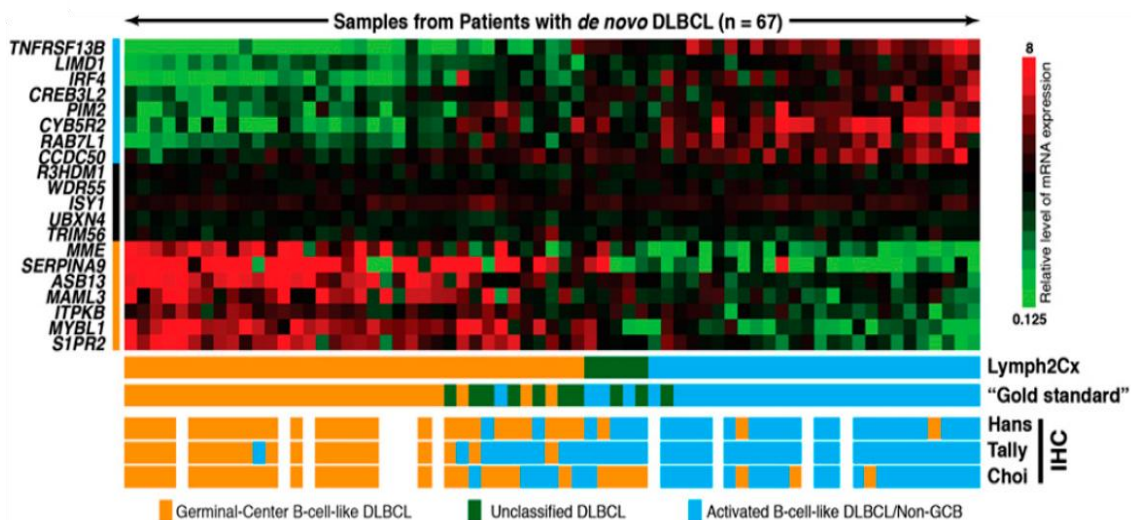
  

	Poor	Fair	Moderate	Good	Very good
K	Poor	Fair	Moderate	Good	Very good

**4. ábra.** Coutinho és munkacsoportja meghatározta 151 DLBCL esetben a sejteredetet kilenc különböző IHC algoritmussal, majd páronként összehasonlították a kapott eredményeket. Látható, hogy a Natkunam algoritmussal meghatározott sejteredet mutatta a legrosszabb konkordanciát, míg a legkoherensebb eredményeket a Visco és a Choi módszerekkel kapták. Összességében a Hans és a módosított Hans algoritmussal történő besorolás állt a legközelebb a többi algoritmus eredményeihez [64]. *Rövidítés: \*: módosított.*

Ezen eredmények bizonyítják, hogy bár a sejteredet meghatározása igen fontos lenne, az IHC módszerek nem bizonyultak megbízhatónak, míg az arany standard GEP vizsgálat nehezen elérhető a rutin diagnosztika részére. Ezért nagy szükség volt egy olyan módszerre, amely segítségével a GEP vizsgálat pontosságával akár FFPE mintákból meghatározható a sejteredet. Scott és munkatársai 2013-ban kidolgoztak egy digitális génexpressziós vizsgálatot, az ún. NanoString Lymphoma Subtyping Test-et (LST, vagy másnéven Lymph2Cx), ami alkalmas formalin fixált paraffinba ágyazott (FFPE) biopsziás minták sejteredetének meghatározására. A NanoString LST assay-vel 20 gén expressziós profiljának meghatározására van lehetőség. A panelben megtalálható gének az 5. ábrán láthatóak. Ezek közül 8 gén overexpressziója figyelhető meg ABC fenotípus, és 7 gén overexpressziója jellemző a GCB fenotípus esetén. Ezenkívül a génpanelben további 5 gén ún. housekeeping funkciót tölt be. Vizsgálatukba 68 DLBCL-ben szenvedő beteg mintáját vonták be, majd meghatározták a sejteredetet az

arany standard GEP módszerrel friss fagyasztott mintákból [65], valamint FFPE mintákból NanoString LST módszerrel és három immunhisztokémiai algoritmussal (Hans, Choi és Tally). Az arany standard módszerrel 58 esetben tudták az ABC vagy GCB fenotípust biztosan megállapítani, 10 eset úgynevezett „unclassified” (UC) csoportba tartozott. A UC csoportba azok az esetek kerültek, ahol a GEP módszerrel 90%-nál kisebb biztonsággal lehetett az ABC vagy a GCB fenotípust meghatározni [66]. A különböző módszerekkel kapott eredményeket összehasonlítva a GEP eredményekkel, a NanoString technológia 98%-os, a Tally algoritmus 94%-os, a Hans algoritmus 91%-os, míg a Choi algoritmus csupán 83%-os konkordanciát mutatott a gold standard GEP módszerrel (5. ábra). Összességében, a NanoString technológia segítségével a prognosztikailag fontos szubtipusok megbízhatóan meghatározhatók FFPE mintából, így ez a módszer akár a rutin diagnosztika részévé is válhat a közeljövőben [67].



**5. ábra.** A NanoString LST assay eredményei (Scott et al.) [67]. A hőtérkép bal szélén látható az LST assay-vel vizsgált 20 gén: a felső 8 gén (*TNFRSF13B*, *LIMD1*, *IRF4*, *CREB3L2*, *PIM2*, *CYB5R2*, *RAB7L1*, *CCDC50*) overexpressziója jellemző ABC fenotípusban, míg az alsó 7 gén (*MME*, *SERPINA9*, *ASB13*, *MAML3*, *ITPKB*, *MYBL1*, *S1PR2*) overexpresszióját GCB fenotípus esetén figyelhetjük meg. A középső 5 gén (*R3HDM1*, *WDR55*, *ISY1*, *UBXN4*, *TRIM56*) housekeeping funkciót tölt be. Az LST assay eredményeit összevetették a gold standard génexpressziós vizsgálat, és három immunhisztokémiai módszer eredményeivel. A legmagasabb egyezés a gold standard módszerhez képest a NanoString LST assay-vel volt megfigyelhető [67]. *Rövidítések:* DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma; IHC: immunhisztokémia; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet.

A két fenotípus között nem csak klinikai lefolyásban van különbség, hanem a heterogenitás citogenetikai és molekuláris szinten is megfigyelhető. A GCB fenotípusú DLBCL közel 50%-ában detektálható az FL-re is jellemző kromoszóma transzlokáció, a t(14;18), mely során a *BCL2* és az *IGH* gének átrendeződése figyelhető meg [68, 69]. Szintén gyakori transzlokáció a *MYC* gént (8q24) érinti, a GCB fenotípusú esetek körülbelül 20%-ában [70]. A DLBCL esetek harmadában a 3q27 kromoszóma-régió (*BCL6* gén lókusza) transzlokációja figyelhető meg, ez a transzlokáció gyakoribb ABC fenotípus esetén [71]. A *MYC* transzlokációt hordozó DLBCL esetek kb. felében *BCL2* és/vagy *BCL6* transzlokáció is megfigyelhető, ezek a high-grade lymphomák egy új csoportját, az ún. double hit lymphomákat alkotják [2].

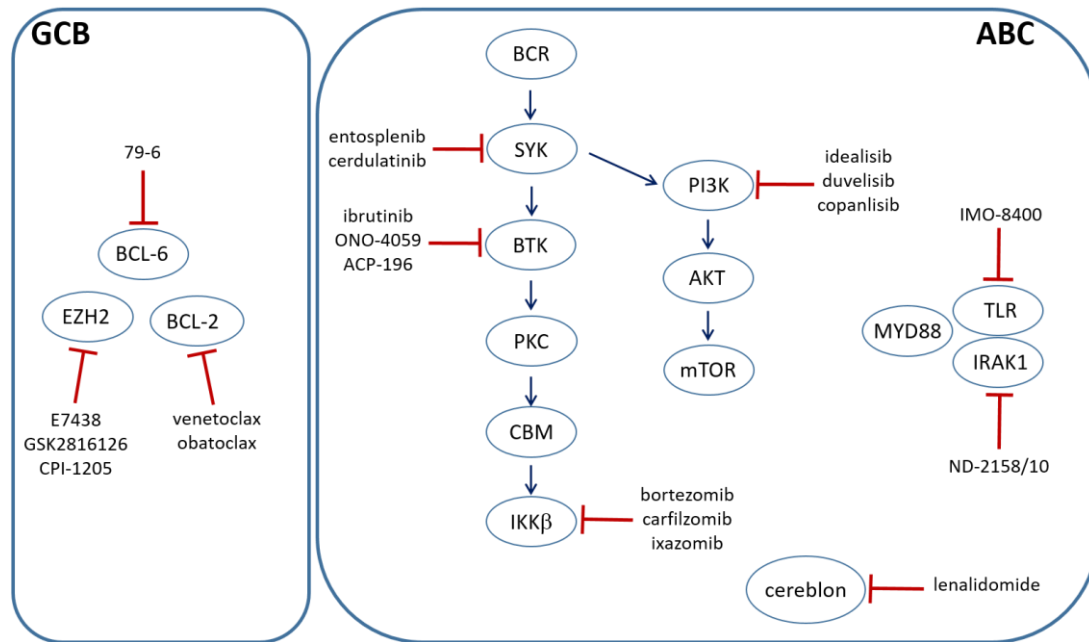
A kópiaszám eltéréseket vizsgálva is megfigyeltek különbségeket a két fenotípus között. A 2p16 és a 12q12 kromoszómányerések, valamint a 10q23 kromoszóma deléciója gyakran láthatóak a GCB szubtípusú DLBCL-ben, ezzel szemben ABC fenotípusban a 3-as kromoszóma triszómiája, vagy a 3q és 18q21-q22 nyérések, valamint 6q21-q22 és 9p21 vesztések jellemzőek [72, 73].

Érdekes módon, ABC és GCB fenotípusban eltérő jelátviteli útvonalak szerepe igazolódott, ennek megfelelően számos gén esetén eltérő mutációs frekvencia jellemző a két fenotípusban. Míg ABC fenotípus esetén főleg az NFκB útvonal aktivációja figyelhető meg a BCR és a TLR útvonalakon keresztül, így a *MYD88*, *CD79B*, *KLHL14*, *SIGLEC10*, *ETV6*, *PIM1* és *TBLIXR1* gének mutációi gyakoribbak. A GCB fenotípusú DLBCL-ben pedig a hiszton modifikáció eltérései jellemzőek; mutációkat az *EZH2*, *GNA13*, *BCL2*, *SGK1*, *SOCS1*, *STAT6* és *TNFRSF14* gének esetén írtak le [47, 51].

A molekuláris heterogenitásnak terápiás relevanciája is lehet a közeljövőben: számos új terápiás szer közöttük a lenalidomide, a bortezomib és az ibrutinib hatékonyabbnak bizonyult ABC fenotípusú DLBCL-ben [74-76]. A lenalidomidot relabált/refrakter DLBCL-ben szenvedő betegek kezelésére próbálták, és azt figyelték meg, hogy az ORR 8,7% volt a GCB fenotípusú betegekben, míg 52,9%-nak adódott non-GCB fenotípus esetén. Ezenkívül a medián PFS is kedvezőbb volt a non-GCB esetekben (1,7 vs. 6,2 hónap) [74]. A proteaszóma inhibitor bortezomibot kombinálva a DA-EPOCH (dose-adjusted etoposide, vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide és prednison) kezeléssel szignifikánsan jobb ORR (83% vs. 13%) és medián OS (10,8 hónap vs. 3,4 hónap) volt megfigyelhető ABC fenotípus esetén a GCB fenotípusú



esetekhez képest. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a bortezomib fokozza ABC fenotípus esetén a kemoterápiás szerek hatását, azonban ez GCB fenotípus esetén nem jellemző [75]. Az irreverzibilis Bruton tirozin kináz gátló ibrutinib is hatékonyabb volt ABC fenotípusú betegekben, a GCB fenotípusúakhoz képest (ORR 37% vs. 5%; medián OS 10,32 vs 3,35 hónap) [76]. A két szubtypusban szerepet játszó fontosabb jelutakat, terápiás célpontokat és gátlószereket a 6. ábra mutatja be.



**6. ábra.** DLBCL pathogenezisében szerepet játszó fő útvonalak a sejteredet szerint és az elérhető célzott terápiás szerek. *Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet.* Sujobert és mtsai. alapján [77] módosítva.

A primer agyi lymphomákban először Montesinos-Rongen és munkatársai végeztek GEP vizsgálatot, mely során megállapították, hogy a PCNSL-ben az tumorsejtek főleg késői GC B-sejtekből származnak, és az expressziós mintázata alapján a PCNSL nagyon hasonlít a szisztémás DLBCL-hez. A PCNSL késői GC B-sejt eredetét megerősítették a normál GC és nem-GC sejtek expressziós profiljának összehasonlításával, mi szerint a PCNSL sejtek a memória B-sejtekhez állnak közelebb [78].

Az IHC módszereken alapuló sejteredet vizsgálat PCNSL-ben az esetek több mint 70%-át non-GCB fenotípusba sorolta [20, 35, 79, 80]. A nodális DLBCL-ben ismert,

hogy a non-GCB fenotípus rosszabb OS-sel jár, így a PCNSL-re jellemző non-GCB típus részben magyarázhatja a szisztémás DLBCL-hez képest látott rosszabb kimenetelt [20].

Bár Scott és munkatársai tanulmánya alapján tudjuk, hogy a NanoString LST technológia alkalmas a sejteredet meghatározására nodális DLBCL-ben FFPE mintákból, PCNSL-ben ezt a módszert korábban még nem alkalmazták.

#### 4. A primer központi idegrendszeri lymphomák genetikai háttere

A PCNSL pontos pathogenezeise még napjainkig sem teljesen tisztázott. Ennek hátterében egyrészt az áll, hogy a betegség viszonylag ritka, másrészt korlátozott a genetikai vizsgálatokhoz szükséges tumorminta elérhetősége.

A 2000-es évek elejére már számos NHL-ban leírtak visszatérő kromoszóma eltéréseket, pl. a t(14;18) transzlokációt a folliculáris lymphomában, a t(8;14) transzlokációt Burkitt-lymphomában, és nodális DLBCL-ben az *IG* és a *BCL6* lokuszokat érintő transzlokációkat [81]. Felmerült a kérdés, hogy vannak-e PCNSL-ben visszatérő kromoszóma eltérések, és ha vannak, akkor jellemzőek-e a szisztémás DLBCL-ben megfigyelhető transzlokációk a PCNSL-re is. Azonban a citogenetikai vizsgálatokat PCNSL-ben megnehezítette, hogy a sztereotaxiás biopsziás minták mérete általában kicsi, valamint az osztódásra képes sejtek száma alacsony. A fluorescens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálat elterjedésével lehetőség nyílt a PCNSL-ben is a citogenetikai mintázat vizsgálatára. Először Montesinos-Rongen és munkatársai végeztek FISH vizsgálatot PCNSL-ben. Az esetek 46%-ában töréspontot azonosítottak az *IGH* lokuszban, ami gyakori az extracerebrális B-sejtes lymphomákban is [82]. Míg a folliculáris lymphomában, a Burkitt lymphomában és a köpenysejtes lymphomában az *IGH* transzlokációs partnere lehet a *MYC*, *BCL2*, vagy az *BCL6* [81], addig a transzlokációs partnert PCNSL-ben, a minták kis mérete miatt nem sikerült azonosítani [82]. Az *IGH* lokusz eltérései mellett, az esetek 23-38%-ában a *BCL6* génben is megfigyeltek töréspontokat [82, 83], hasonlóan a szisztémás DLBCL-hez, ahol 30-40%-ban lehet a *BCL6* transzlokációt azonosítani [81]. Néhány évvel később megállapították, hogy az esetek 40%-ában a *BCL6* transzlokációs partnere az *IGH* [84]. További gyakori kromoszóma eltérésként írták le a PCNSL esetek 45%-ában megfigyelhető del(6)(q22) eltérést. Mind a del(6)(q22), mind a *BCL6* transzlokációja rosszabb teljes túléléssel jár [84]. A PCNSL-re jellemző citogenetikai eltéréseket a szisztémás DLBCL-ben korábban azonosítottakkal összehasonlítva elmondható, hogy míg a *BCL6* transzlokáció előfordulása hasonló a két lymphomában [85], addig PCNSL-ben a del(6)(q22) gyakoribb (45% vs. 25%) [72], és az *IGH* transzlokáció ritkább (13% vs. 45%) [86], mint szisztémás DLBCL-ben.

A 2000-es évek elején leírták az aberráns szomatikus hipermutációt (ASHM), mint

a genom instabilitás egyik formáját, mely feltehetően a normál B-sejt érés során bekövetkező szomatikus hipermutáció hibás működése. A szisztémás DLBCL-ek több mint 50%-ában ASHM érinti a *PIMI*, a *PAX5*, a *RhoH/TTF*, és a *c-MYC* protoonkogéneket [46]. Később ezen protoonkogének ASHM-ját PCNSL-ben is megfigyelték [87]. Ezek a gének részt vesznek a B-sejt fejlődésben és differenciációban, a proliferáció és az apoptózis szabályozásában, így a mutációk fontos szerepet játszhatnak a lymphomagenezisben [87].

A genetikai instabilitáshoz számos daganattípusban a különböző kópiaszám eltérések (CNA) is hozzájárulnak [88, 89]. PCNSL-ben a leggyakoribb (75%) kromoszómanyerés a 17p13.3 lókuszt (*TMEM93* és *P2RX5*), és a 22q13.33 lókuszt (*IL17REL* és *MLC1*) érinti [90]. Emellett visszatérő kromoszómanyerés figyelhető meg a 7q, a 11q, a 12q és a 16p kromoszómarégiókban is [90-93]. Kromoszómavesztés jellemző a 6p, a 6q, a 8p, a 9p, a 14q és a 22q kromoszómakarokon [90]. Az esetek több mint harmadában a 9p21.3 kromoszóma régió (*CDKN2A* lókuszt) deléciója [90-92], míg az esetek mintegy felében a 6p21 (*HLA* gén lókuszt) deléciója is kimutatható [92, 93]. A sejtciklus szabályozó ciklin-dependens kináz inhibitor kódoló *CDKN2A* gén homozigóta delécióját összefüggésbe hozták rövidebb PFS-sel, és OS-sel [92]. Szintén rövidebb volt azon betegek össz-túlélése, akiknél kimutatták a 6q21 (*PRDMI*) lókuszt delécióját [91].

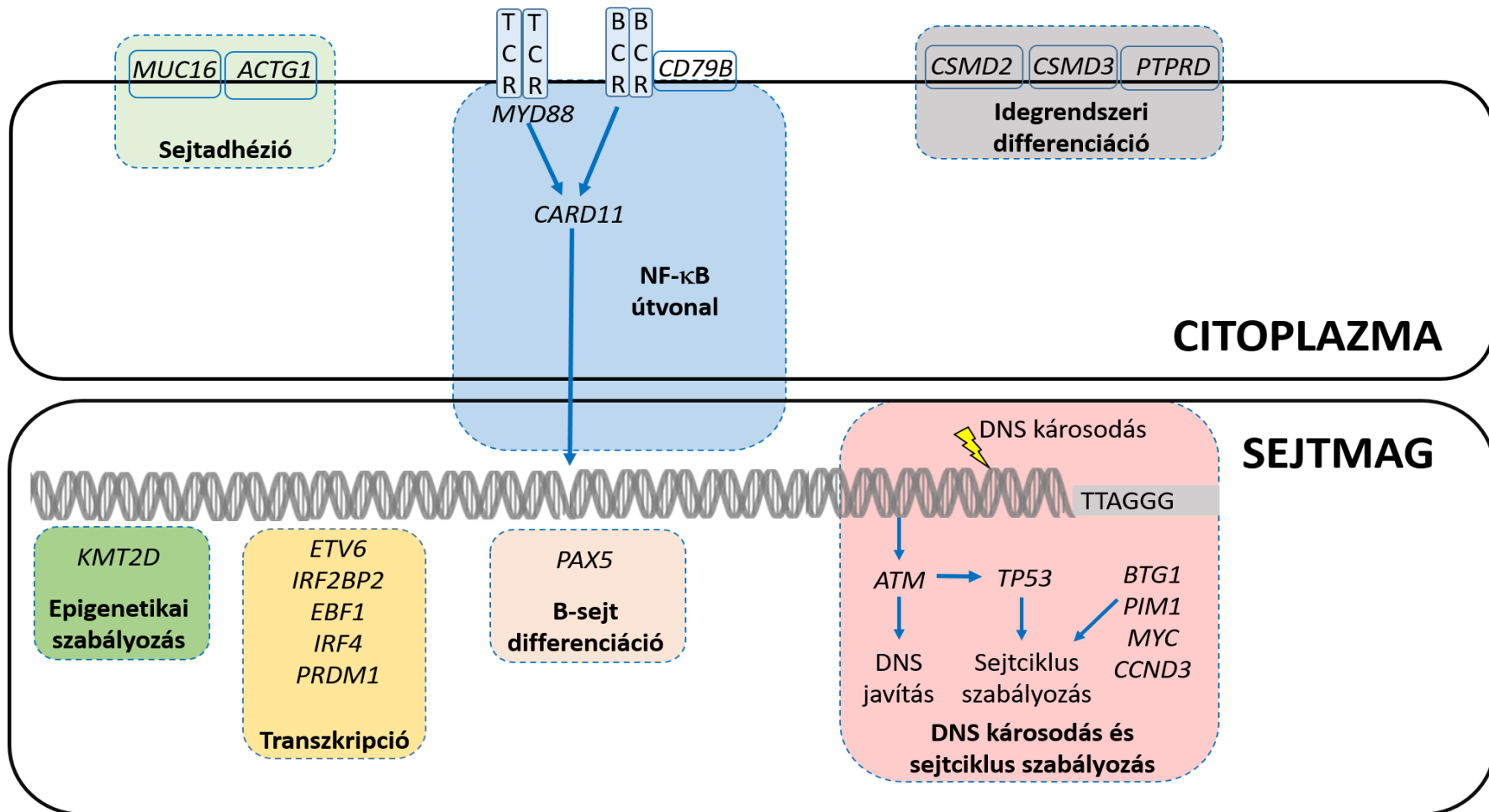
Hatalmas áttörés volt a genomikában az ezredforduló után megjelenő új-generációs szekvenálás (NGS), melynek segítségével a hagyományos Sanger szekvenáláshoz képest gyorsabban és olcsóbban lehet akár teljes genom (WGS) vagy teljes exom (WES) szekvenciát meghatározni [94]. Az elmúlt években az NGS megjelenésével és fejlődésével lehetővé vált számos szolid daganat [95-99], és hematológiai malignitás [48, 49, 100, 101] molekuláris hátterének pontosabb megismerése. A PCNSL-ben visszatérő mutációkat írtak le a B-sejt proliferáció és differenciáció, a B-sejt receptor (BCR), a Toll-like receptor (TLR), az NF- $\kappa$ B út vonal, a kromatin modifikáció, a sejtciklus szabályozás és az immunfelismerés génjei között [91, 102-104].

Az első kis esetszámú WES vizsgálattal PCNSL-ben visszatérő mutációkat találtak a *MYD88* (38%) és a *TBLIXR1* (14%) génekben, melyek az NF- $\kappa$ B út vonalhoz tartoznak [92]. Korábban a *CARD11* génben azonosított mutációk alapján már felmerült

az NF- $\kappa$ B útvonal aktivációjának a szerepe PCNSL-ben [105], melyet az új NGS eredmények tovább erősítettek.

A következő években több NGS tanulmány jelent meg, melyekben az NF- $\kappa$ B útvonal génjeinek (*MYD88*, *CD79B*, *TBL1XR*) mutációi mellett számos különböző biológiai folyamatban részt vevő gén eltéréseit leírták, pl. a transzkripció (*ETV6*, *IRF2BP2*, *EBF1*, *IRF4*), a sejtciklus szabályozás (*BTG1*) és a sejtadhézió (*MUC16*, *ACTG1*) génjeit [102]. Visszatérő mutációkat találtak továbbá olyan génekben (*OZD4*, *CSMD2*, *CSMD3* és *PTPRD*), melyek fiziológiásan is szerepet játszanak az idegrendszeri differenciációban, ami talán magyarázhatja a betegség idegrendszeri tropizmusát [103]. Nodális DLBCL-lel összehasonlítva keresték a PCNSL-re jellemző specifikus mutációkat, mely során a *TOX* és *PRKCD* gének visszatérő biallélikus inaktiválódását figyelték meg PCNSL-ben, ami az extracerebrális DLBCL-ben nem azonosítható [91]. Ismert tumorszupresszor gének (*ATM*, *TP53*, *PTEN*) eltéréseit is leírták PCNSL-ben [106]. A mutációk klinikai szerepét vizsgálva, az *ATM* mutációi rosszabb eseménymentes túléléssel (EFS), a *PTEN* eltérései rosszabb OS-sel jártak [106], míg a *HLA-C* gén mutációi esetén rövidebb PFS volt jellemző [107]. Érdekes módon egy kutatócsoport, azt találta, hogy a *MYD88* mutációt hordozó esetek közel harmadában, ugyanaz a mutáció (*MYD88* p.L265P), ugyan kisebb mutációs frekvenciával, de kimutatható digitális droplet polimeráz láncreakció (ddPCR) segítségével a perifériás vérmintákban is [107]. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a *MYD88* mutáció pozitív ún. „pre-lymphoma” sejtek először az idegrendszeren kívül jelennek meg, majd oda belépve további genetikai és epigenetikai eltérések kialakulása által elősegítik a tumorgenezist. Bár ezen megfigyelés bizonyításához további vizsgálatok szükségesek, összességében felmerül, hogy a *MYD88* aktiváció fontos kezdeti genetikai eltérés, amely elősegítheti a lymphocyták túlélését a központi idegrendszerben [107]. Ezen eredményeken túl, az NGS vizsgálatok a korábban már ismert ASHM protoonkogének mellett számos új potenciális ASHM célpontot (*KLHL14*, *OSBP10*, *SUSD2*, *ETV6*, *BTG2*, *DUSP2* és *BTG1*) azonosítottak [35, 103].

A PCNSL-ben eddig azonosított fontos jelútvonalak és folyamatok a 7. ábrán láthatóak, míg a különböző NGS tanulmányokat a 3. táblázat foglalja össze.



7. ábra. A PCNSL esetekben visszatérő mutációk figyelhetők meg a sejtadhézió, a transzkripció, az NF-κB útvonál, a sejtciklus szabályozás, az idegrendszeri differenciáció és a B-sejt differenciáció génjeiben. Rövidítések: BCR: B-sejt receptor; DNS: dezoxiribonukleinsav; TCR: T-sejt receptor.

## 3. táblázat. Az NGS tanulmányok összefoglalása

Study	Minta szám	Módszer	Legfontosabb gének, eltérések	Referencia
Gonzalez-Aguilar és mtsai. 2012	4	WES	<i>MYD88 (38%), TBL1XR1 (14%), PIM1 (3%)</i>	[92]
Bruno és mtsai. 2014	9	WES	<i>MYD88 (38%), CD79B (30%), PIM1 (22%), TBL1XR1 (19%), ETV6 (16%), IRF4 (14%), IRF2BP2 (11%), EBF1 (11%)</i>	[102]
Vater és mtsai. 2014	9	WES	<i>CD79B (44%), PIM1 (44%), ODZ4 (44%), MUC16 (55%), MYD88 (33%)</i>	[103]
Braggio és mtsai. 2015	10	WES	<i>MYD88 (79%), CD79B (40%), PIM1 (30%), BTG2 (30%), CARD11 (30%), GNAI3 (20%), TNFAIP3 (20%), BRAF (10%)</i>	[91]
Balint és mtsai. 2016	19	célzott szekvenálás (48 gén)	<i>KDR (68%), KIT (58%), ERBB4 (53%), EGFR (53%), FBXW7 (53%)</i>	[106]
Fukumura és mtsai. 2016	41	WES	<i>PIM1 (100%), BTG2 (93%), MYD88 (85%)</i>	[107]
Grommes és mtsai. 2017	177	célzott szekvenálás (586 gén)	<i>MYD88 (58%), CD79B (41%), PIM1 (56%), BTG2 (36%), PRDM1 (27%), TOX (20%), IRF4 (17%), MLL2 (28%), MSH3 (27%), TBL1XR1 (23%)</i>	[35]
Zhou és mtsai. 2018	22	célzott szekvenálás (64 gén)	<i>PIM1 (77%), MYD88 (63%), CD79B (69%) KMT2D (50%)</i>	[137]

Rövidítések: mtsai: munkatársai; NGS: új-generációs szekvenálás (next-generation sequencing) WES: teljes exom szekvenálás (whole exome sequencing).

A fentiek alapján látható, hogy a PCNSL-re nagyfokú genetikai komplexitás és molekuláris heterogenitás jellemző. Az eddigi genetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a PCNSL-ben az NF- $\kappa$ B, a BCR és a TLR útvonalak aktivációja figyelhető meg. Ugyanakkor a legtöbb tanulmány eredményei kis esetszámon alapulnak és a különböző tanulmányokban azonosított mutációs gyakoriságok nagy szórást mutatnak [91, 92, 102, 103, 106]. A daganatok tumorigenezisének pontos feltérképezése lehetővé teheti a közeljövőben az újonnan kifejlesztett célzott terápiák személyre szabott alkalmazását. Ehhez, és a PCNSL pathogenezisének pontosabb megértéséhez további nagyobb mintaszámon történő genetikai vizsgálatok szükségesek. A szomatikus mutációk és bizonyos metabolikus útvonalak kapcsolatát vizsgálva Grommes és munkatársai azt figyelték meg, hogy a *CD79B* mutáció jelenléte esetén az mTOR útvonal fokozott aktivitása jellemző PCNSL-ben [35], ugyanakkor az mTOR útvonal szerepét a PCNSL pathogenezisében ezidáig alig vizsgálták.



## **5. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák és a primer központi idegrendszeri lymphomák metabolizmusa és energiaháztartása**

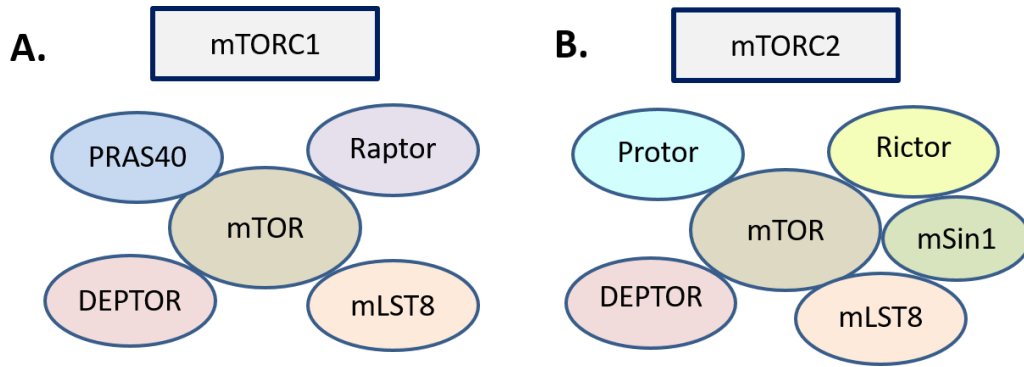
### **5.1. Az mTOR útvonal bemutatása**

Az mTOR útvonal számos kulcsfontosságú biológiai folyamat, többek között a fehérjeszintézis, a sejtnövekedés, a proliferáció és a túlélés irányítója, így szabályozza a sejtek energiahelyzetét és a stresszre adott válaszát is. Létfontosságú szerepét mutatja, hogy állatkísérletekben az mTOR kináz, vagy az mTOR komplex elemeit kódoló gének kiütése embrionális letalitáshoz vezetett [108].

Az mTOR egy szerin-treonin kináz, amely a PI3K/AKT útvonal downstream effektora. Az mTOR két különböző multiprotein komplex alkotásában vesz részt, melyek mind felépítésükben, mind funkciójukban eltérnek egymástól. Az mTOR komplex 1 (mTORC1) az mTOR-ból, a Raptorból, az mLST8-ből és két negatív szabályozóból, a PRAS40-ből és a DEPTOR-ból áll (8A. ábra). Az mTORC1-et a PI3K/AKT útvonal aktiválja, és a TSC1/TSC2 komplex gátolja. Fontos szerepet játszik a riboszóma bioszintézis regulációjában az S6K1 aktivációján és az mRNS transzláció inhibitor 4E-BP1 gátlásán keresztül [109].

Az mTOR komplex 2 (mTORC2) az mTOR mellett a Rictorból, az mLST8-ből, az mSIN1-ből, a Protorból, és a DEPTOR-ból áll (8B. ábra). Az mTORC2-t különböző növekedési faktorok aktiválják, majd foszforilálja az AKT-ot a Ser473 foszforilációs helyen.

A két mTOR komplex amellet, hogy felépítésükben és funkciójukban különböznek, eltérő érzékenységet mutatnak az antifungális és antiproliferatív hatású gátlószerre, a rapamycinre, míg az mTORC1 érzékeny, addig az mTORC2 rezisztensnek bizonyul [110, 111].



**8. ábra.** A két mTOR komplex szerkezete [112]. **A.** Az mTORC1-et az mTOR, a Raptor, a PRAS40, a Deptor és az mLST8 alkotja. **B.** Az mTORC2 felépítésében az mTOR, a Protor, a Rictor, a Deptor, az mLST8 és a mSin1 vesz részt.

Az mTORC1 jelátviteli út foszforilációs kaszkádot az aktivált AKT indítja be. Különböző növekedési faktorok, pl. inzulinszerű növekedési faktor (IGF), az epidermális növekedési faktorok (EGF1, EGF2/HER2, EGF3), a vaszkuláris növekedési faktor (VEGF), és a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) hatására a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) átalakítja a foszfatidilinozitol-biszfoszfátot (PIP2) foszfatidilinozitol-triszfoszfáttá (PIP3) (9. ábra). A PIP3 hatására az AKT a sejtmembránhoz kötődik, ez a kötődés lehetővé teszi, hogy a PDK1 és az mTORC2 az AKT-ot a Thr308-as és a Ser473-as foszforilációs helyeken foszforilálja. Ezt követően az AKT foszforilálja a TSC2-t, amely így nem tud komplexet formálni a TSC1-gyel. A TSC1/TSC2 komplex gátlás alatt tartja a GTPáz Rheb-et, amely a gátlás alól felszabadulva aktiválja az mTORC1-et a Ser2448 helyen történő foszforilációval. Az aktivált mTORC1 foszforilálja az S6K1-et a T389-es pozícióban és a 4E-BP1-et, melyhez a komplex Raptor komponensének, illetve az S6K1 és a 4E-BP1 úgynevezett TOR signaling motívumának interakciója szükséges. Az aktivált S6K1 az S6 fehérjét foszforilálja, amely mRNS transzlációhoz vezet. A foszforilálatlan 4E-BP1 megköti és inaktiválja az eIF4E-t, ezzel gátolva a fehérje transzlációt, azonban miután foszforilálja az mTORC1, leválik az eIF4E-ről, amely felszabadul a gátlás alól, így beindul az mRNS transzláció. Növekedési faktorok jelenlétében, ha megfelelő a sejtek energia és tápanyag ellátottsága az mTORC1 hatására fokozódik a fehérjeszintézis és a sejtek növekedése,

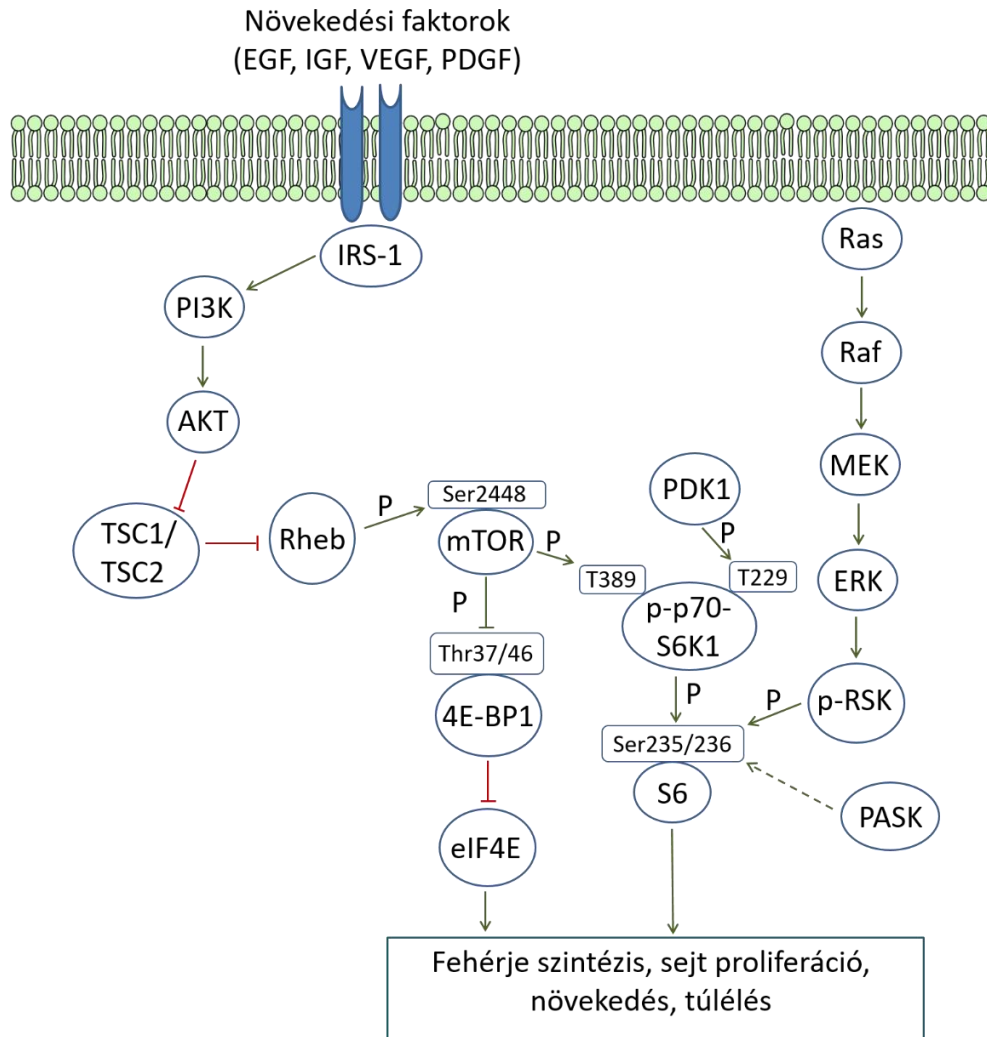
proliferaációja jön létre. Az mTOR továbbá az autofágia egyik fontos negatív regulátora. Amennyiben kedvezőtlené válnak a sejt körülményei, az mTOR útvonal aktivitása csökken, felfüggesztődnek az energiaigényes makromolekula szintézis folyamatai, fokozódik az autofágia, mely során az intracelluláris tápanyagforrás mobilizálódik, így lehetővé válik a sejtek túlélése [112].

Ismerve az mTOR útvonal központi szerepét a proliferációban és az autofágia gátlásában, nem meglepő, hogy számos malignitásban leírták az mTOR útvonal aktiválódását. Megfigyelték az AKT amplifikációját emlő és petefészek daganatokban [113], az S6K1 overexpresszióját emlő daganatokban [114], és magas PI3K aktivitást petefészek, gasztrointesztinális, emlő és prosztatata daganatokban [113].

Emellett az mTOR útvonal diszfunkciója számos hematológiai daganat, köztük a nodális DLBCL kialakulásában is szerepet játszhat. Sebestyén és munkatársai 68 nodális DLBCL-en az mTOR útvonal legszenzitívebb markerének, a p-S6 fehérjének az expressziója mellett, több mTOR-ral kapcsolatos foszfo-fehérje jelenlétét vizsgálták immunhisztokémiával. Az esetek 30%-ában GCB fenotípust találtak, és ezekben az esetekben gyakorlatilag nem volt mTOR aktivitás. Ezzel szemben az non-GCB fenotípus esetén 80%-ban figyelték meg valamelyik mTOR-ral kapcsolatos fehérje expresszióját [115]. Meglepő módon, egy másik munkacsoport ettől eltérő eredményeket kapott: A magas mTOR aktivitást mutató esetek 92%-a GCB fenotípusú volt, és ezekben az esetekben rosszabb prognózis volt megfigyelhető [116]. Az eltérő eredményeket részben magyarázhatja, hogy a két munkacsoport más fehérjék expresszióját vizsgálta. Míg az első vizsgálatban a p-S6, a p-mTOR, p-EB-P1 és p-S6K1 fehérjék expresszióját határozták meg [115], addig a másik munkacsoport a mTOR teljes endogén szintjét detektálták [116]. További kutatások is alátámasztották a PI3K/AKT/mTOR útvonal aktivációját DLBCL-ben, az esetek közel 50%-ban a p-AKT, a p-p70-S6K1 és a p-4E-BP1 pozitivitása volt kimutatható. Ebben a vizsgálatban azonban nem találtak szignifikáns összefüggést a sejteredet és az mTOR aktivitás között [117]. A különböző munkacsoportok eltérő eredményei abból adódhatnak, hogy nincs egységes konszenzus az mTOR aktivitás meghatározására. Számos munkacsoport a p-S6 fehérje expresszióját méri legfontosabb markerként, azonban az S6 riboszómális fehérje foszforilációja mTOR független módon is bekövetkezhet [118-120].

Az S6 fehérje C terminális részén öt foszforilációs hely található, ezek a Ser235, a

Ser236, a Ser240, a Ser244 és a Ser247 [121]. *In vitro* a p70-S6K1 mellett a RAS/ERK útvonal részeként a p90-S6K (RSK) is foszforilálhatja az S6 fehérjét. Roux és munkatársai azt figyelték meg, hogy míg a p70-S6K1 az összes, addig az RSK csak a Ser235/236-os foszforilációs helyen foszforilál. Eredményeik felhívják a figyelmet arra a gyakori hibára, hogy az mTOR útvonal aktivitásának vizsgálatához sok munkacsoport a p-S6 Ser235/236 ellenanyagot használja, azonban az esetek egy részében ez téves eredményt adhat, hiszen a pozitivitás akár a RAS/ERK/RSK útvonal aktivációját is jelezheti [118]. Az mTORC1 hatására az S6K1 a T389-es pozícióban foszforilálódik, azonban a PDK1 foszforilálhatja a T229-es helyen [120]. A PI3K/AKT/mTOR útvonal mellett fontos szerepet játszik a metabolizmus szabályozásában a Per-Arnt-Sim kináz (PASK) is. A PASK élesztőkben, egérben és az emberben is a glükóz homeosztázis szabályozásában vesz részt. Schlaflí és munkatársai kimutatták, hogy a PASK *in vitro* és *in vivo* is foszforilálhatja az S6 fehérjét a Ser235/236-os pozícióban [119].



**9. ábra.** A PI3K/AKT/mTOR és Ras/ERK útvonalak összefoglalása. Különböző növekedési faktorok hatására a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) átalakítja a foszfatidilinozitol-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) foszfatidilinozitol-triszfoszfáttá (PIP<sub>3</sub>), majd a PIP<sub>3</sub> hatására az AKT a sejtmembránhoz kötődik, ez a kötődés lehetővé teszi, hogy az AKT-t foszforilációját. Az AKT aktivációját követően az mTORC1 is foszforilálódik, amely hatására az S6K1 és a 4E-BP1 foszforilációja következik be. Az aktivált S6K1 az S6 fehérjét foszforilálja, amely mRNS translációhoz vezet. A foszforilálatlan 4E-BP1 megköti és inaktíválja az eIF4E-t, azonban foszforiált állapotban leválik az eIF4E-ről, amely felszabadul a gátlás alól, így beindul az mRNS transláció. Ezen kaszkádon keresztül, ha megfelelő a sejtek energia és tápanyag ellátottsága fokozódik a fehérjeszintézis és a sejtek növekedése, proliferációja jön létre. Ugyanakkor az S6 foszforilációja a Ras-ERK útvonalon keresztül is bekövetkezhet. *Rövidítések: P: foszforiláció, p: foszforilált.*

## 5.2. Az mTOR inhibitorok terápiás alkalmazása

Az mTOR útvonal kóros aktiválódása számos daganatban megfigyelhető, hiszen több olyan folyamatot szabályoz, melyek kedvezőek a tumor növekedésnek. Éppen ezért a 2000-es években felmerült az mTOR gátlók kifejlesztése és bevezetése különböző tumorok terápiás eszköztárába. Az első mTOR gátló a rapamycin volt, amelyet először immunszuppresszív szerként használták vesetranszplantált betegekben, a kilökődés megelőzésére [122]. Azonban a rapamycinnek rossz a vízdékonysága és kémiaailag instabil vegyület, így számos kedvezőbb farmakológiai tulajdonsággal bíró rapamycin analóg, ún. rapalóg jelent meg. Az első generációs inhibitorok közül, a temsirolimust 2007-ben engedélyezte az FDA előrehaladott vesesejtes karcinóma [123], majd 2008-ban MCL kezelésében, az everolimust pedig előrehaladott veserák mellett neuroendokrin tumorok és a HER2 pozitív emlőrák terápiájában törzskönyvezték [122]. A rapamycin és az első generációs rapalógok hátránya az, hogy az mTOR katalitikus, kináz aktivitását indirekt módon gátolják, így az mTORC1 funkciók csak egy részét befolyásolják [122, 124]. Ezen felül az mTORC1 gátlásával megszűnik az S6K függő negatív visszacsatolás a PI3K/AKT felé, ami fokozott PI3K/AKT aktivitást eredményez, elősegítve ezzel a proliferációt és a túlélést [125], ami a kezelés sikertelenségéhez vezet. Fázis I/II vizsgálatokban különböző kettős-inhibitorokat tesztelnek, melyek a PI3K-t és mindkét mTOR komplexet hatékonyan tudják gátolni, ezzel kedvezőbb tumorelles hatás elérésére képesek [126-128]. Az első generációs gátlószerekhez képest a második generációs inhibitorok már az mTOR katalitikus aktivitását gátolták, így az mTORC1 általi összes foszforilációs esemény gátlása mellett az mTORC2-re is negatív hatással vannak. Ezen gátlószerek hatékonyságát jelenleg is fázis I/II vizsgálatokban tesztelik [122].

Bár már régóta ismert az mTORC1 szerepe különböző daganatok tumorigenezisében, PCNSL-ben sokáig nem vizsgálták az útvonal aktivitását. Nitta és munkatársai IHC-val vizsgálták 24 PCNSL mintán a Rheb, a p-4E-BP1 és a p-S6 fehérjék expresszióját. Mindhárom fehérje fokozott expresszióját figyelték meg, az esetek legalább 70%-ában. Eredményeik alapján felmerül az mTOR útvonal lehetséges szerepe a PCNSL pathogenezisében [129].

Átfogó klinikai és genetikai vizsgálatokban, Grommes és munkatársai összefüggést találtak az mTOR útvonal aktivitása és a *CD79B* mutációk jelenléte között. PCNSL esetekben IHC módszerrel a p-4E-BP1 és a p-S6 fehérjék expresszóját vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy szignifikánsan több *CD79B* mutációt hordozó esetben azonosítottak pozitívítást mindkét mTOR downstream fehérje esetében, mint a *CD79B* mutáció negatív mintákban. Ez felveti a lehetőséget annak, hogy a *CD79B* mutációt hordozó PCNSL esetekben a PI3K/AKT/mTOR útvonal konstitutív aktivációja van jelen [35].

Annak ellenére, hogy nodális DLBCL-ben már rég óta folynak klinikai vizsgálatok mTOR gátlókkal, igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre az mTOR aktivitására PCNSL-ben.

A PCNSL pathogeneziséről, valamint pontos molekuláris és metabolikus háttéréről heterogén irodalmi adatok állnak a rendelkezésünkre. Napjainkban egyre nagyobb szerepük van a személyre szabott terápiáknak az onkológiai kezelésben, ehhez azonban szükséges az adott betegség minél pontosabb megismerése. PCNSL-ben a célzott terápiás lehetőségek megalapozásához szükségesnek gondoltuk egy nagyobb betegcsoporton a mutációs profil és a sejteredet meghatározását, majd ezek korrelációját a klinikummal. Az utóbbi években felmerült az mTOR útvonal aktivációjának szerepe is PCNSL-ben, azonban napjainkig kevés kutatócsoport vizsgálata a pontos mechanizmusokat, így fontosnak tartottuk az mTOR útvonal aktivitásának tisztázását is PCNSL-ben.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

- A primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák sejteredetének meghatározása NanoString LST technológia segítségével.
- A NanoString LST technológia és a hagyományos IHC módszerek összehasonlítása primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák esetén.
- A *CARD11*, *CCND3*, *CD79B*, *C-MYC*, *CSMD2*, *CSMD3*, *IRF4*, *KMT2D*, *MYD88*, *PAX5*, *PIM1*, *PRDM1*, *PTPRD* és *TP53* gének nagy érzékenységgű célzott újraszekvenálása új-generációs szekvenálás segítségével, primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák esetén.
- Összefüggések keresése a sejteredet, a genom szintű eltérések és a betegek túlélése között primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomákban.
- Az mTOR útvonal aktivitásának meghatározása primer központi idegrendszeri lymphomákban.
- Az S6 riboszómális fehérje mTOR független foszforilációjának vizsgálata.



### III. MÓDSZEREK

#### 1. RNS és DNS alapú vizsgálatok

##### 1.1. Beteganyag

Tanulmányunkban összesen 81 primer és 18 szekunder központi idegrendszeri lymphomában szenvedő beteg FFPE mintáit vizsgáltuk. Az FFPE minták három centrumból álltak a rendelkezésünkre, a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből, a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetéből és a University College London (UCL) Neurológiai Intézetének Neuropatológiai osztályáról. RNS alapú vizsgálatainkhoz 77 PCNSL, és 17 SCNSL mintát használtunk, míg a DNS alapú vizsgálatok során 64 PCNSL és 12 SCNSL mintával dolgoztunk. Az RNS és DNS kohortban vizsgált minták átfedést mutattak. Az összes PCNSL eset közül 60 mintát, míg az SCNSL esetek közül 11 mintát mind RNS alapú, mind DNS alapú vizsgálatba is bevontuk. A lymphomák sejteredete 2 PCNSL és 1 SCNSL eset kivételével a Hans algoritmussal lett meghatározva. A betegek klinikai adatai a 4. táblázatban láthatóak. Túlélési adatok 65 PCNSL-ben és 17 SCNSL-ben szenvedő beteg esetén álltak a rendelkezésünkre, a medián követési idő 10 hónap (1-127) volt. A kezelési adatok 46 PCNSL és 12 SCNSL esetben állt rendelkezésünkre.

Kutatásaink során mindenben a hatályos jogszabályoknak megfelelően, az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB: 14383-2/2017/EKU) és a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB-1552012) engedélyeinek birtokában, valamint a Helsink Deklarációban foglaltak szerint jártunk el.

#### 4. táblázat. A DNS és RNS alapú vizsgálatba bevont betegek klinikai adatai

Eset szám	PCNSL/ SCNSL	Nem	Diagnóziskori életkor (év)	OS (hónap)	Esemény	Sejteredet (IHC)
P1	PCNSL	férfi	75	4.6	elhunyt	non-GCB
P2	PCNSL	nő	64	3.9	elhunyt	non-GCB
P3	PCNSL	nő	60	9.0	él	GCB

P4	PCNSL	nő	73	2.7	elhunyt	non-GCB
P5	PCNSL	nő	77	7.5	elhunyt	non-GCB
P6	PCNSL	férfi	53	19.0	elhunyt	NA
P7	PCNSL	nő	66	7.8	elhunyt	non-GCB
P8	PCNSL	nő	59	2.1	elhunyt	non-GCB
P9	PCNSL	nő	72	NA	NA	non-GCB
P10	PCNSL	nő	80	NA	NA	non-GCB
P11	PCNSL	nő	51	NA	NA	non-GCB
P12	PCNSL	férfi	67	56.0	él	non-GCB
P13	PCNSL	nő	77	3.0	elhunyt	non-GCB
P14	PCNSL	férfi	64	4.1	elhunyt	non-GCB
P15	PCNSL	férfi	73	16.5	elhunyt	non-GCB
P16	PCNSL	férfi	59	11.0	elhunyt	non-GCB
P17	PCNSL	férfi	56	3.5	él	non-GCB
P18	PCNSL	nő	55	17.2	elhunyt	non-GCB
P19	PCNSL	nő	92	1.8	elhunyt	non-GCB
P20	PCNSL	férfi	77	5.3	elhunyt	non-GCB
P21	PCNSL	nő	54	NA	NA	non-GCB
P22	PCNSL	férfi	67	39.5	él	non-GCB
P23	PCNSL	nő	78	NA	NA	non-GCB
P24	PCNSL	férfi	72	5.7	elhunyt	non-GCB
P25	PCNSL	nő	47	NA	NA	non-GCB
P26	PCNSL	nő	43	11.5	elhunyt	GCB
P27	PCNSL	nő	78	23.0	él	non-GCB
P28	PCNSL	nő	78	22.7	él	non-GCB
P29	PCNSL	nő	62	7.9	él	non-GCB
P30	PCNSL	nő	70	15.5	él	non-GCB
P31	PCNSL	nő	59	NA	NA	non-GCB
P32	PCNSL	nő	70	13.7	él	non-GCB
P33	PCNSL	nő	43	12.0	elhunyt	non-GCB
P34	PCNSL	férfi	46	68.0	elhunyt	non-GCB
P35	PCNSL	nő	68	6.9	él	non-GCB
P36	PCNSL	férfi	72	NA	NA	non-GCB
P37	PCNSL	férfi	71	0.5	elhunyt	non-GCB
P38	PCNSL	férfi	76	0.9	elhunyt	non-GCB
P39	PCNSL	férfi	70	34.6	elhunyt	non-GCB
P40	PCNSL	nő	51	52.1	él	non-GCB
P41	PCNSL	férfi	59	88.2	él	non-GCB
P42	PCNSL	férfi	70	NA	NA	non-GCB
P43	PCNSL	nő	59	14.0	elhunyt	non-GCB
P44	PCNSL	nő	70	0.5	elhunyt	non-GCB
P45	PCNSL	nő	51	27.0	él	non-GCB
P46	PCNSL	férfi	66	2.2	elhunyt	non-GCB
P47	PCNSL	nő	81	0.01	elhunyt	non-GCB
P48	PCNSL	nő	65	2.1	elhunyt	non-GCB

P49	PCNSL	férfi	35	NA	NA	non-GCB
P50	PCNSL	férfi	68	8.9	elhunyt	NA
P51	PCNSL	férfi	73	27.3	él	GCB
P52	PCNSL	férfi	61	NA	NA	non-GCB
P53	PCNSL	nő	77	NA	NA	non-GCB
P54	PCNSL	férfi	58	NA	NA	non-GCB
P55	PCNSL	férfi	76	1.0	elhunyt	non-GCB
P56	PCNSL	nő	63	30.8	elhunyt	non-GCB
P57	PCNSL	férfi	63	54.9	elhunyt	non-GCB
P58	PCNSL	nő	64	0.5	elhunyt	non-GCB
P59	PCNSL	férfi	66	13.9	elhunyt	non-GCB
P60	PCNSL	nő	82	3.5	elhunyt	non-GCB
P61	PCNSL	nő	64	2.1	elhunyt	non-GCB
P62	PCNSL	férfi	71	6.3	elhunyt	non-GCB
P63	PCNSL	férfi	56	NA	NA	non-GCB
P64	PCNSL	nő	66	NA	NA	non-GCB
P65	PCNSL	nő	85	0.9	elhunyt	non-GCB
P66	PCNSL	férfi	75	0.5	elhunyt	non-GCB
P67	PCNSL	nő	68	86.4	él	non-GCB
P68	PCNSL	férfi	70	0.5	elhunyt	non-GCB
P69	PCNSL	nő	70	34.1	elhunyt	non-GCB
P70	PCNSL	nő	57	48.2	elhunyt	non-GCB
P71	PCNSL	nő	75	59.1	él	non-GCB
P72	PCNSL	férfi	69	39.4	él	non-GCB
P73	PCNSL	férfi	50	13.8	elhunyt	non-GCB
P74	PCNSL	nő	68	43.1	elhunyt	non-GCB
P75	PCNSL	nő	67	NA	NA	non-GCB
P76	PCNSL	nő	20	116.4	él	GCB
P77	PCNSL	férfi	70	0.5	elhunyt	non-GCB
P78	PCNSL	nő	63	14.3	elhunyt	non-GCB
P79	PCNSL	férfi	68	0.1	elhunyt	non-GCB
P80	PCNSL	férfi	75	13.8	elhunyt	non-GCB
P81	PCNSL	férfi	65	2.3	elhunyt	non-GCB
S1	SCNSL	nő	78	NA	NA	NA
S2	SCNSL	férfi	72	0.6	elhunyt	GCB
S3	SCNSL	férfi	63	127.3	elhunyt	non-GCB
S4	SCNSL	férfi	61	33.0	él	GCB
S5	SCNSL	nő	65	84.6	elhunyt	GCB
S6	SCNSL	nő	25	5.0	elhunyt	GCB
S7	SCNSL	nő	67	61.6	él	GCB
S8	SCNSL	férfi	56	0.5	elhunyt	GCB
S9	SCNSL	nő	55	82.6	él	non-GCB
S10	SCNSL	férfi	21	13.9	él	GCB
S11	SCNSL	nő	37	84.5	él	GCB
S12	SCNSL	nő	69	7.2	elhunyt	GCB

S13	SCNSL	nő	75	3.7	elhunyt	non-GCB
S14	SCNSL	nő	55	0.5	elhunyt	non-GCB
S15	SCNSL	nő	59	24.8	elhunyt	non-GCB
S16	SCNSL	férfi	45	3.8	elhunyt	non-GCB
S17	SCNSL	nő	71	3.9	elhunyt	non-GCB
S18	SCNSL	férfi	19	86.4	él	non-GCB

*Rövidítések: GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; NA: nincs adat; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; OS: ösztülélés; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma.*

## 1.2. RNS alapú vizsgálatok

### 1.2.1. RNS izolálás

A biopsziás mintákból 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd a mintákhoz mértünk 320 µl deparaffinizáló oldatot (Qiagen deparaffinisation solution), ezt követően a mintákat 3 percig 56 °C-on inkubáltuk. Az RNS izolálást a Recover all kit-tel (Ambion/ Life Technology) végeztük. A Proteináz K hozzáadását követően 50 °C-on inkubáltuk, 1 óráig (vagy amíg a szövet teljesen feloldódott), ezt követte 15 perc inkubáció 80 °C-on. Fontos volt, hogy a 80 °C-os inkubáció nem haladhatta meg a 15 percet, mert az az RNS-ek degradálódásához vezethet. Amikor az inkubációs idő letelt, a csövekből az alsó fázist új csövekbe mértük át. Összeállítottuk az Izolációs mixet, mintánként 240 µl Isolation Additive-ből és 550 µl 100%-os etanolból, majd 790 µl-t mértünk a mintákhoz. Vortexelést követően ebből a keverékből 700 µl-t pipettáztunk a filteres tisztítóoszlopokra, majd 30 másodpercig 10000g-n centrifugáltuk őket. Ezt követte két mosás, először 700 µl Wash1 oldatot, majd 500 µl Wash2/3 oldatot mértünk a csövekbe. Mindkettő mosóoldat hozzáadását követően 10000g-n 30 másodpercig centrifugáltuk a csöveket. Következő lépésként készítettünk egy DNáz mixet, mintánként 6 µl DNáz puffer, 4 µl DNáz, és 50 µl nukleázmentes víz összemérésével, amely lépésre a minták DNS mentesítése miatt volt szükség. Ebből 60 µl-t a filterekre pipettáztunk, és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, melyet háromszori mosás követett. Először Wash1 oldatból 700 µl-t, majd a Wash2/3 oldatból 500 µl-t mértünk a csövekbe, melyet

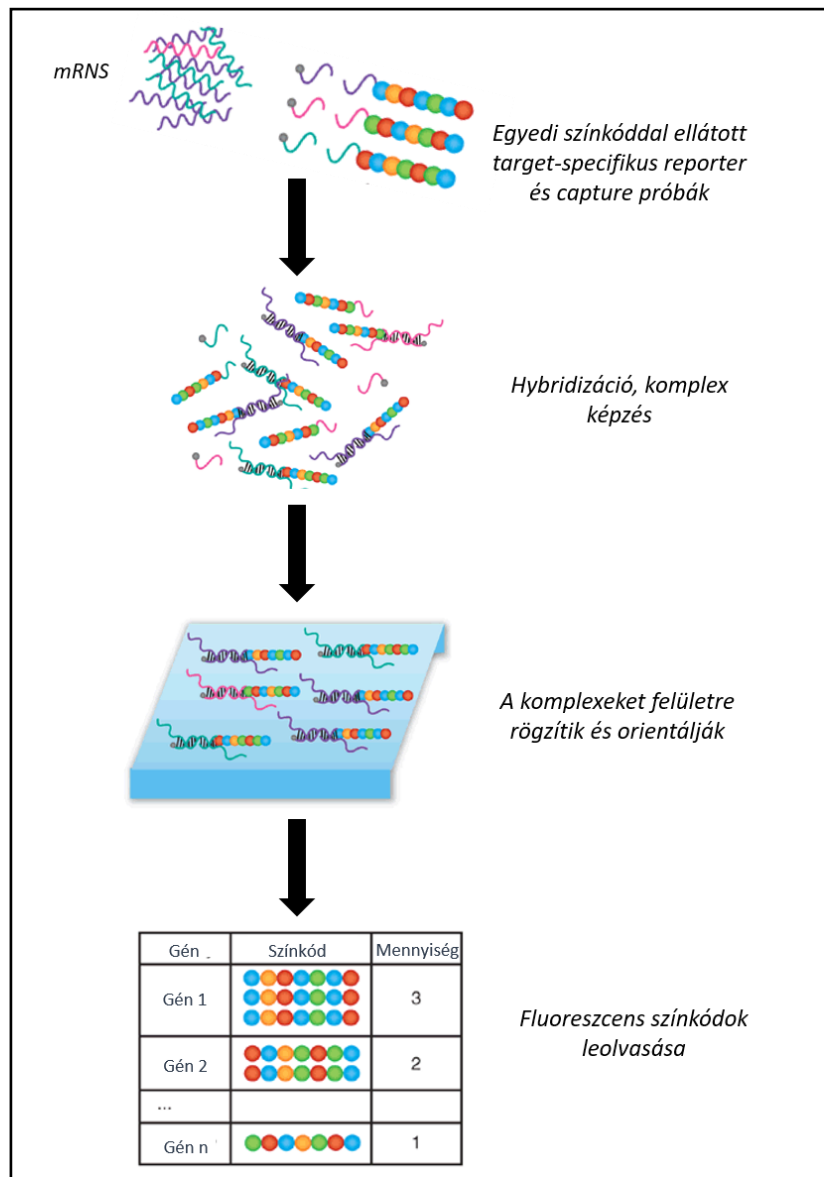
mindkét esetben centrifugálás követett, 30 másodperc, 10000g-n. Végül a Wash 2/3 oldatból ismét 500 µl-t pipettáztunk a csövekre, és 1 percig centrifugáltuk 10000g-n. A filtereket új, mintaszámmal ellátott csövekbe helyeztük át, és 40 µl elúciós oldatot mértünk a filterek közepére. Szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltuk őket, ezzel növelve a végső RNS koncentrációt. Az utolsó centrifugálást maximális sebességen 1 percig végeztük. Az RNS koncentrációkat Nanodrop készülékkel mértük le, majd felhasználásig a mintákat -80 °C-on tároltuk.

### 1.2.2. A sejteredet meghatározása NanoString LST-vel

A mintánkból izolált RNS-ek sejteredetének meghatározására a NanoString LST assay alkalmazásával, az nCounter® Analysis System (NanoString Technologies, Inc., Seattle, USA) segítségével került sor. Az RNS mintákhoz először egyedi színkóddal ellátott target-specifikus reporter és capture próbákat adunk, amit egy hybridizáló, komplexképző lépés követ. További lépésként a komplexek speciális felületre való rögzítése, és egy irányba való orientálása történik. Végül a génexpresszió meghatározásához a fluoreszcens színkódok leolvasása szükséges. Az assay segítségével 20 gén expresszióját határozhatjuk meg, ebből 15 gén az ABC vagy a GCB fenotípusra specifikus, míg 5 gén ún. housekeeping funkciót tölt be. A génexpressziós adatokat a housekeeping génekhez normalizáltuk. A housekeeping gének ezenfelül a kiindulási RNS minták minőségellenőrzéséhez is szükségesek. A szubtípus meghatározásához minden gén esetén meghatározható egy úgynevezett „linear predictor score” (LPS), amely a 10. ábrán látható képlettel számolható ki. Az LPS az egyes gének expressziós értékének és egy génenként eltérő súlytényezőnek a szummázásával adható meg, majd az előre definiált küszöbértékek alapján határozható meg a szubtípus (ABC, ha az  $LPS \geq 2433.5$ ; GCB, ha az  $LPS \leq 1907.8$ ; a kettő érték között UC). A módszer összefoglalása a 11. ábrán látható.

$$LPS = \sum_j a_j X_j$$

**10. ábra.** Linear predictor score (LPS) meghatározásának képlete, ahol a  $X_j$  az adott,  $j$  gén expressziójának értéke, az  $a_j$  az adott,  $j$  géne meghatározottfaktor/súlytényező.



**11. ábra.** A NanoString LST módszer. Az RNS mintákhoz először egyedi színkóddal ellátott target-specifikus reporter és capture próbákat adunk, majd egy hybridizáló, komplexképző lépés következik. Ezt követően a komplexeket egy speciális felületre rögzítjük, majd egy irányba orientáljuk őket. Végül a génexpresszió meghatározása a fluoreszcens színkódok leolvasásával történik. Fortina és munkatársai [130] munkája alapján módosítva. Rövidítés: *mRNS*: messenger ribonukleinsav.

### 1.3. DNS alapú vizsgálatok

#### 1.3.1. DNS izolálás

Az FFPE mintákat először deparaffinizáltuk az 1.2.1. fejezetben ismertetettek szerint. A DNS minták izolálásához az FFPE Tissue Kit-et (Qiagen) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az inkubációt követően a csövekbe mértünk 180 µl ATL puffert, majd a csöveket 1 percig 10000 rpm-en centrifugáltuk. A centrifugálást követően az alsó víztiszta rétegben gyűlt össze a paraffinmentes szövetminta. Az alsó fázisba 20 µl proteináz K-t mértünk és a mintákat először 1 órán át (vagy amíg a teljesen lízis bekövetkezett) 56 °C-on, majd 1 órán át 90 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével 200 µl AL puffert mértünk a mintákhoz, vortexelés után pedig 200 µl etanolt mértünk a csövekbe. A teljes mennyiségű lizátumot QIAamp MinElute oszlopokra mértük, és 6000g-n 1 percig centrifugáltuk az oszlopokat. Ezt követően két lépésben tisztítottuk a mintákat, először 500 µl AW1 puffert, majd 500 µl AW2 puffert mértünk az oszlopokra, mindkét puffer hozzáadását 6000g-n 1 perc centrifugálás követte. A tisztítási lépések után az oszlopokat 20000g-n 3 percig centrifugáltuk, ezzel a membránokat teljesen etanol mentesítettük. Ezt követően az oszlopokat új Eppendorf csövekbe helyeztünk, és 50 µl ATE puffert mértünk a membránok közepére. A megfelelő DNS koncentrációhoz az ATE puffer hozzáadása után 5 percig szobahőn inkubáltuk az oszlopokat, végül 1 perc maximális sebességű centrifugálást végeztünk. Az izolált DNS koncentrációkat Qubit dsDNA HS AssayKit-tel, Qubit fluorométerrel (Invitrogen) határoztuk meg. Mérendő mintánként 199 µl Buffer-t és 1 µl reagenst összemértünk, majd ebből az elegyből 198 µl-t 2 µl DNS mintához adtunk. A gép kalibrálása után lemértük a DNS koncentrációkat, amelyeket ng/µl mértékegységben kaptunk meg. A mintákat a további felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

#### 1.3.2. Nagy érzékenységű, célzott, új-generációs újraszekvenálás és a bioinformatikai analízis

A PCNSL-ben gyakori visszatérő mutációt hordozó 14 gén (*CARD11*, *CCND3*, *CD79B*, *C-MYC*, *CSMD2*, *CSMD3*, *IRF4*, *KMT2D*, *MYD88*, *PAX5*, *PIM1*, *PRDM1*,

*PTPRD* és *TP53*) ismert mutációs forrópontokat hordozó exonjaira új-generációs szekvenálási génpanelt terveztünk az Illumina cég Truseq Custom Amplicon eljárását alkalmazva (5. táblázat).

**5. táblázat.** Az új-generációs szekvenálás során vizsgált gén régiók

<b>Gén</b>	<b>Vizsgált régió</b>	<b>Transzkriptum azonosító</b>
<i>CARD11</i>	Exon 4, 6, 8, 9	ENST00000396946
<i>CCND3</i>	Exon 2, 5	ENST00000372991
<i>CD79B</i>	Exon 3, 4, 5	ENST00000006750
<i>CSMD2</i>	Exon 15, 41, 45, 69	ENST00000373388
<i>CSMD3</i>	Exon 16, 22, 37	ENST00000297405
<i>IRF4</i>	Exon 2, 3	ENST00000380956
<i>KMT2D</i>	Exon 10, 15, 19, 32, 34, 39, 40, 47, 48, 49, 52	ENST00000301067
<i>MYC</i>	Exon 2, 3	ENST00000621592
<i>MYD88</i>	Exon 2, 3, 4, 5	ENST00000396334
<i>PAX5</i>	Exon 1, 2, 5	ENST00000358127
<i>PIMI</i>	Exon 2, 3, 4	ENST00000373509
<i>PRDM1</i>	Exon 2, 5, 7	ENST00000369096
<i>PTPRD</i>	Exon 29, 35	ENST00000381196
<i>TP53</i>	Exon 5, 6, 7, 8	ENST00000269305

A szekvenálási könyvtárak elkészítéséhez TruSeq Custom Amplicon Library Kit (Illumina), úgynevezett dual-strand protokollját használtunk. Ezzel a módszerrel lehetőség van mindkét DNS szál egymástól függetlenül történő szekvenálásához, mely során a két szál külön A és B könyvtárba kerül, így FFPE minták esetén is megbízható eredményt kapunk. A minőség kontrollt követően a mintákat HiSeq4000 új-generációs szekvenáló készülék (Illumina) segítségével szekvenáltuk meg.

Az adatok elemzése során először a keletkezett szekvenciákat a *Homo sapiens* GRCh37 referenciagenomhoz illesztettük a BaseSpace Sequence felületen a BWA v0.7.13 aligner használatával. A BAM fájlok válogatása és indexelése a SAMtools v1.7 modullal történt, és a szekvenálás során keletkezett hibák kiszűréséhez minden egyes könyvtáron lefuttattuk a GATK v4.0 Base Quality Score Recalibration eljárást. Az egy-nukleotid polimorfizmusok (SNP) és az inzerció-deléciók azonosítása LoFreq v2.1 variáns azonosító segítségével történt. Az elsődlegesen azonosított variánsok annotációját mind az SnpEff v4.3i-val, mind az ANNOVAR v2017Jul17-vel elvégeztük. A *TP53* gén kódoló régiójában azonosított variánsok annotációja a TP53 specifikus Seshat és IARC



adatbázisokban is megtörtént. Végül csak azokat a szomatikus variánsokat tekintettük valódi eltérésnek, amelyek mindkét összetartozó könyvtárban (A és B) jelen voltak.

### 1.3.3. Validálás Sanger szekvenálással

A 20%-nál magasabb variáns allél frekvenciájú (VAF) szomatikus variánsok egy részét Sanger szekvenálással validáltuk. A 6. táblázatban a validáláshoz használt forward és reverse primerek szekvenciája látható.

**6. táblázat.** Az NGS-sel azonosított mutációk Sanger szekvenálással történő validálása során használt primerek szekvenciái

<b>Gén</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>CARD11</i>	TGGAGGAGGAATGTAAGCTGG	GCAGCTCCTGGTTTTTGGTC
<i>CCND3</i>	CACTCAGGGAGAGCCTCAG	GCCCCTCCTCTGCTTAGTG
<i>CD79B</i>	TCTGATCTCCATCCCTCTCC	CCAACCACACCAGCAGATAG
<i>IRF4</i>	CGGAGAGTTCGGCATGAG	TTCTCCTCGTTCTCCCACAC
<i>MYD88</i>	TGGAACAGACAAACTATCGACTG	AGGAGGAGATGCCCAGTATC
<i>PAX5</i>	TGGAAACTTTTCCCTGTCCA	CGGAGTTTGCACATCTGGAG
<i>PIM1</i>	TTCATCACGGAAAGGGGAGC	ACCCGAAGTCGATGAGCTTG
<i>PRDM1</i>	TGGGATTCTGGTGCTGATGG	CCTCAAGGGCAAGTAGGGAG
<i>TP53</i>	CTTGGGCCTGTGTTATCTCC	GTGTGCAGGGTGGCAAGT

## 2. Fehérje alapú vizsgálatok és sejttenyésztés

### 2.1. Anyagok

Immunhisztokémiai vizsgálatunk során 31 PCNSL-ben és 51 nodális DLBCL-ben szenvedő beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott biopsziás mintáit elemeztük. Valamennyi esetet a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében diagnosztizálták 1992 és 2014 között. A lymphomák sejteredetét a diagnózis során 29 PCNSL és 47 DLBCL esetben Hans algoritmussal határozták meg a rutin diagnosztikus munkafolyamat során (7. táblázat).

A fehérje alapú vizsgálatok és a DNS/RNS alapú vizsgálatok során használt minták között átfedés nem volt, mivel a PCNSL biopsziás minták mérete általában kicsi, így nem állt rendelkezésünkre elegendő FFPE anyag valamennyi vizsgálat elvégzéséhez.

**7. táblázat.** A fehérje alapú vizsgálatunkban szereplő PCNSL-ben és DLBCL-ben szenvedő betegek adatai

Beteg	Nem	Életkor a diagnóziskor	Sejteredet (IHC)	Beteg	Nem	Életkor a diagnóziskor	Sejteredet (IHC)
PCNSL1	férfi	68	non-GCB	PCNSL17	nő	66	non-GCB
PCNSL2	férfi	55	non-GCB	PCNSL18	férfi	54	non-GCB
PCNSL3	férfi	63	non-GCB	PCNSL19	nő	57	non-GCB
PCNSL4	nő	57	non-GCB	PCNSL20	férfi	53	non-GCB
PCNSL5	férfi	79	NA	PCNSL21	nő	63	non-GCB
PCNSL6	férfi	76	non-GCB	PCNSL22	férfi	68	non-GCB
PCNSL7	nő	66	non-GCB	PCNSL23	nő	61	non-GCB
PCNSL8	nő	62	non-GCB	PCNSL24	nő	82	non-GCB
PCNSL9	férfi	61	non-GCB	PCNSL25	nő	80	non-GCB
PCNSL10	nő	46	NA	PCNSL26	nő	65	non-GCB
PCNSL11	férfi	51	non-GCB	PCNSL27	nő	68	non-GCB
PCNSL12	férfi	37	non-GCB	PCNSL28	férfi	42	non-GCB
PCNSL13	férfi	80	non-GCB	PCNSL29	nő	27	non-GCB
PCNSL14	nő	63	non-GCB	PCNSL30	nő	70	non-GCB
PCNSL15	nő	70	non-GCB	PCNSL31	nő	76	non-GCB
PCNSL16	férfi	69	non-GCB				

Beteg	Nem	Életkor a diagnóziskor	Sejteredet (IHC)	Beteg	Nem	Életkor a diagnóziskor	Sejteredet (IHC)
DLBCL1	nő	NA	non-GCB	DLBCL27	nő	13	GCB
DLBCL2	férfi	83	non-GCB	DLBCL28	férfi	74	non-GCB
DLBCL3	nő	64	NA	DLBCL29	férfi	82	GCB
DLBCL4	nő	34	non-GCB	DLBCL30	nő	79	non-GCB
DLBCL5	férfi	68	NA	DLBCL31	férfi	62	non-GCB
DLBCL6	férfi	86	non-GCB	DLBCL32	nő	48	GCB
DLBCL7	férfi	63	NA	DLBCL33	férfi	79	non-GCB
DLBCL8	nő	62	non-GCB	DLBCL34	nő	85	non-GCB
DLBCL9	nő	54	non-GCB	DLBCL35	nő	66	non-GCB
DLBCL10	nő	79	non-GCB	DLBCL36	nő	76	NA
DLBCL11	férfi	59	non-GCB	DLBCL37	nő	82	non-GCB
DLBCL12	nő	73	non-GCB	DLBCL38	nő	42	GCB
DLBCL13	nő	75	GCB	DLBCL39	férfi	70	GCB
DLBCL14	férfi	78	non-GCB	DLBCL40	nő	84	non-GCB
DLBCL15	férfi	20	GCB	DLBCL41	férfi	68	GCB
DLBCL16	nő	77	non-GCB	DLBCL42	nő	76	non-GCB
DLBCL17	férfi	30	non-GCB	DLBCL43	nő	29	non-GCB
DLBCL18	nő	48	non-GCB	DLBCL44	nő	49	non-GCB
DLBCL19	férfi	16	non-GCB	DLBCL45	férfi	66	non-GCB
DLBCL20	férfi	84	non-GCB	DLBCL46	férfi	66	non-GCB
DLBCL21	nő	20	non-GCB	DLBCL47	férfi	69	non-GCB
DLBCL22	férfi	69	non-GCB	DLBCL48	férfi	85	non-GCB
DLBCL23	nő	63	non-GCB	DLBCL49	férfi	73	GCB
DLBCL24	férfi	72	non-GCB	DLBCL50	nő	15	non-GCB
DLBCL25	férfi	58	non-GCB	DLBCL51	férfi	65	non-GCB
DLBCL26	nő	54	GCB				

*Rövidítések: DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; NA: nincs adat; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma.*

## 2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A 4 µm-es FFPE metszeteket először deparaffináltuk xilol és alkohol segítségével, majd az endogén peroxidáz blokkolását végeztük 10 percig perjódsvav oldattal (2,3mg/ml), majd 10 percig Na-borohidrid oldattal (0,1mg/ml) 10-10 percig, és 30%-os hidrogén-peroxid és metanol 1:9 arányú keverékével 20 percig. Az antigén feltárást magas

nyomású elektromos kuktában 27 percig, citrát pufferben (pH=6) végeztük. Az aspecifikus antigéneket 3%-os lószérummal blokkoltuk 20 percen keresztül, majd a metszeteket egész éjszaka nedves kamrában inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal 4 °C-on (8. táblázat). Másnap reggel TBST (Tris, NaCl és Polysorbat 20 oldata) mosást követően, másodlagos előhívó rendszerként a Novolink Polymert (Leica-Novocastra) használtuk. Először a metszetekre 1-1 cseppet mértünk a Novocastra Post-primary blockból, és 30 percig nedves kamrában inkubáltuk. TSBT mosást követően, 1-1 csepp Novolink polimert adtunk a metszetekre, így is 30 percig inkubáltuk a mintáinkat, melyet mosás követett. Majd a reakciókat 3,3'-diaminobenzidin (DAB- DAKO) kromogénnel tettük láthatóvá, a reakciót PBS-ben (phosphat buffered salin) állítottuk le, a háttérfestést hematoxylinnal végeztük, végül lefedtük a metszeteket.

**8. táblázat.** Vizsgálatunkban használt elsődleges ellenanyagok és hígításaik

<b>Elsődleges ellenanyag</b>	<b>Hígítás</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Katalógus szám</b>
p-mTOR	1:100	Cell Signaling Technology	#2976
p-S6	1:100	Cell Signaling Technology	#2211
p-4EBP1	1:1600	Cell Signaling Technology	#2855
p(T389)-p70S6K1	1:1000	Abcam	ab59208
p(T229)-p70S6K1	1:50	Abcam	ab126818
p-RSK	1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-12445
PASK	1:100	Abcam	ab154053

*Rövidítés: p: foszforilált.*

Az IHC festéseket két patológus értékelte, egymástól függetlenül. Az mTOR útvonalhoz kapcsolódó fehérjék expressziójának kiértékelése során a festődés erősségét 0, 1, vagy 2-es pontszámmal jellemeztük, (0 a hiányzó, 1 a gyenge, míg 2 a mérsékelt vagy erős festődést jelentette). A pozitív tumorsejtek arányát 1-3-ig pontoztuk (1: <10%, 2: 10-50%, 3: 50%<) [116].

Az egyes fehérjék expresszióját a festődés intenzitásra és a pozitív tumorsejtek arányára kapott pontjaik összeszorzásával határoztuk meg. A fehérje expressziót negatívnak tartottuk, ha az összpont 0, gyengének, ha 1-2, közepesnek, ha 3-4 és erősnek, ha 6 volt. Összességében az expressziót 3 pont felett tekintettük pozitívnak. Az mTOR

útvonalat aktiválnak véleményeztük, ha a p-mTOR vagy a három downstream fehérjéből (p(T389)-p70S6K1, p-S6, p-4E-BP1) legalább kettő pozitív volt.

### 2.3. Sejtenyésztés és *in vitro* kezelések

*In vitro* kísérleteinkhez egy DLBCL sejtvonalat (MedB-1/BHD1) használtunk, melyet Prof. Dr. Peter Möller (Patológiai Intézet, Universität Ulm, Németország) bocsátott rendelkezésünkre. A sejteket Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma) és HyClone RPMI-1640 (GE Lifescience) 4:1 arányú tenyésztőmédiumban 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett tenyésztettük. A médiumhoz 20%-os főtális borjú savót (FCS-Biosera), 0,4% gentamicint (Sandoz) és L-glutamint (Gibco) adtunk. A kísérleteket 4x10<sup>5</sup>/ml sejtszámmal végeztük. A sejteket mTOR inhibitor rapamycinnel (50ng/μl, Sigma), PASK inhibitorral (1μM, BioE-1115, Calbiochem), és a kettő kombinációjával kezeltük, majd 12 és 24 óráig inkubáltuk őket.

### 2.4. A p-S6 expresszió mérése

#### 2.4.1. Western blot

A kezelést követően a sejteket lízis pufferben (50 mM Tris, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF, 1mM PMSF, 0,5 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM proteáz koktél (Sigma) pH=7,5) vettük fel. A fehérje koncentrációkat Qubit Fluorométerrel, Quant-IT protein assay (Invitrogen) segítségével mértük meg. Az egyenlő mennyiségű fehérjéket tartalmazó lizátumokat 1:1 arányban összekevertük Laemmli puffer (BioRad) és 2-merkaptoetanol (20:1) keverékével, majd a mintákat 3 percig forraltuk. Ezt követően a fehérjéket 12,5%-os SDS-PAGE gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd félszáraz módszerrel (BioRad) 0,22 μm pórusú PVDF membránra blottoltuk. A membránokat 5%-os tejporban blokkoltuk, majd p-S6 ellenanyaggal (1:1000, Cell Singaling Technologies) egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Másodlagos ellenanyagként Vectastain Elite Universal ABC másodlagos előhívó kitet (Vector) használtunk. Először 60 percig inkubáltuk a membránokat az 5%-os tejporban hígított biotinizált másodlagos ellenanyaggal (1:3000), majd a kizhoz tartozó A és B reagensből mixet készítettünk, és 30

perc mosást követően 45 percig inkubáltuk a membránokat az AB mixel. Végül a membránokat kemilumineszcens előhívás után (ECL- Advansta Inc.) KODAK Image Station 4000 MM géldokumentációs rendszerrel (Eastman Kodak) fényképeztük. Ezt követően a bemért fehérjék mennyiségének ellenőrzésére a minták  $\beta$ -aktin (Sigma) expresszióját vizsgáltuk 1:5000 hígításban, melyhez HRP konjugált anti-egér IgG (1:2000, Cell Signaling) másodlagos ellenanyagot adtunk, amit szintén ECL segítségével hívtunk elő. A p-S6 expressziót az ImageJ 1.46r szoftver segítségével mértük meg (<https://imagej.nih.gov>).

#### **2.4.2. Flow cytometria**

A BHD1 sejtek endogén p-S6 expresszióját flow cytometriával is vizsgáltuk. Ehhez a PerFix-nc Kitet (Beckman Coulter) használtuk, amely lehetővé tette a sejtek intracelluláris festődését. A kezelést követően a sejtek médiumát eltávolítottuk és 5  $\mu$ l fixáló reagens mellett, 15 percig jégen inkubáltuk a mintákat. Vortexelést követően 300  $\mu$ l permeabilizáló reagenst adtunk, majd a sejteket phycoerythrinrel (PE) konjugált p-S6 ellenanyaggal (Cell Signaling Technology; #5316S) inkubáltuk, 30 percig, jégen, sötétben. Az inkubáció letelte után mosás és centrifugálást követően, a p-S6 expressziót Navios flow cytométerrel (Beckman Coulter) határoztuk meg. Az eredményeket a Kaluza szoftverrel (Beckman Coulter) elemeztük, mintánként minimum 10000 eseményt vizsgáltunk, az eredményeket pedig átlagos fluoreszcencia intenzitás (mean fluorescence intensity; MFI) értékben adtuk meg.

### **3. Statisztikai analízis**

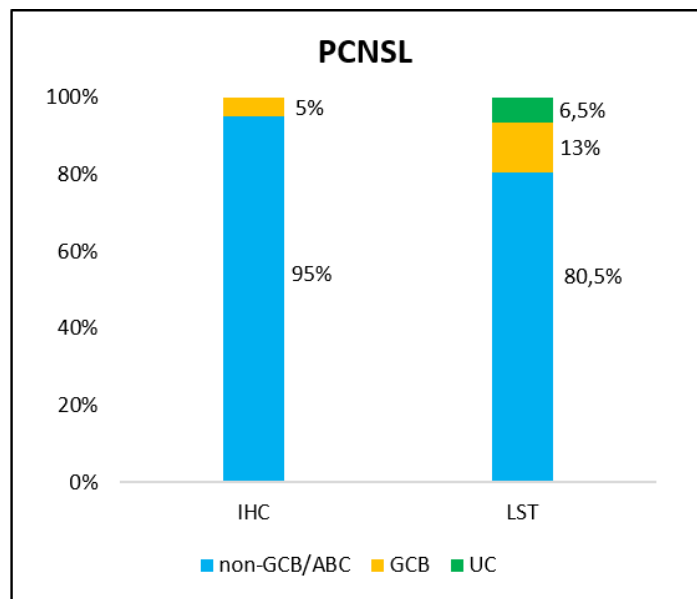
A túlélési idők összehasonlításához Kaplan-Meier túlélési görbéket és log-rank tesztet használtunk a GraphPad PRISM v. 5.0 software segítségével. A kategoriális változókat Pearson-féle Khi négyzet próbával vagy a kis elemszám miatt Fisher féle egzakt próbával analizáltuk, az adatokat SPSS version 20.0 szoftverrel (IBM Corp.) elemeztük. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak  $p \leq 0,05$  esetén tekintettük.

## IV. EREDMÉNYEK

### 1. RNS alapú vizsgálatok

#### 1.1. Sejteredet meghatározása NanoString LST assay-vel és immunhisztokémiával

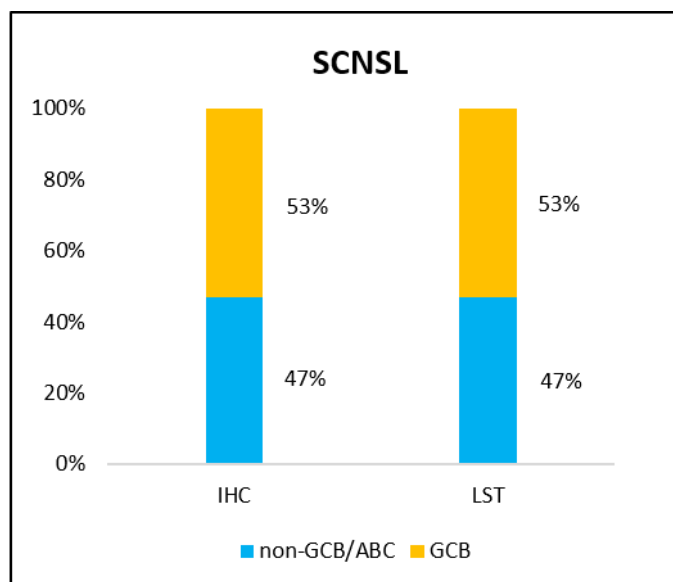
A PCNSL és az SCNSL esetek sejteredet meghatározását NanoString LST assay vizsgálattal végeztük, majd ezeket az eredményeket összehasonlítottuk a Hans-féle algoritmus szerinti immunhisztokémiával kapott eredményekkel. A PCNSL esetében a betegek 80,5%-ában (62/77) ABC fenotípust, 13%-ában (10/77) GCB fenotípust, míg 6,5%-ban (5/77) UC fenotípust találtunk NanoString LST assay-vel. Ezzel szemben a Hans algoritmussal 95%-ban (73/77) non-GCB fenotípust, míg a maradék 5%-ban (4/77) GCB fenotípust határoztunk meg (12. ábra).



**12. ábra.** PCNSL-ben a Hans algoritmussal (IHC) és a NanoString LST-vel (LST) meghatározott sejteredet összehasonlítása. *Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; LST: lymphoma subtyping test; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; UC: „unclassified”.*



A SCNSL esetekben NanoString LST assay-el meghatározva 47% (8/17) ABC fenotípusú, míg 53% (9/17) GCB fenotípusú volt. A szuoptípust Hans algoritmussal vizsgálva ugyanezt az eredményt kaptuk (non-GCB: 47%, GCB: 53%) (13. ábra).



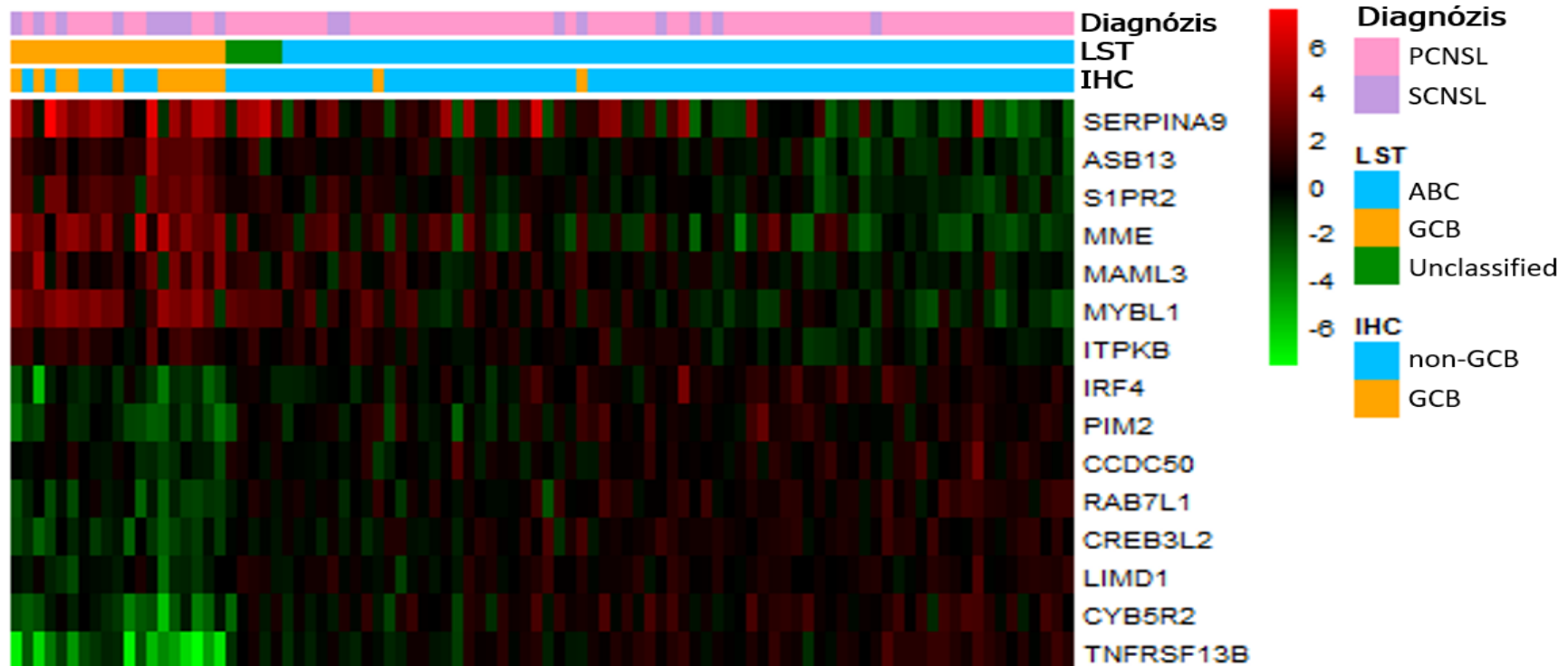
**13. ábra.** SCNSL-ben a Hans algoritmussal (IHC) és a NanoString LST-vel (LST) meghatározott sejteredet összehasonlítása. *Rövidítés: ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; LST: lymphoma subtyping test; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma.*

Összességében az agyi lymphomák 16%-ában (15/94) kaptunk eltérő eredményt a sejteredet meghatározásban a NanoString LST assay és a hagyományos IHC módszerrel: a PCNSL esetek 17%-ában (13/77), míg SCNSL-ben 11,5%-ában (2/17). A PCNSL esetekben IHC-val non-GCB fenotípusként meghatározott minták 15,6%-ában (12/77) kaptunk eltérő eredményt NanoString LST assay-vel, 7 eset GCB fenotípusú lett, míg 5 esetben UC fenotípust azonosítottunk. Egyetlen (1,3%) IHC-GCB esetet találtunk ABC fenotípusúnak NanoString LST assay-vel (14A. ábra). Az SCNSL csoportban csupán 1-1 eset volt, ahol az IHC és a NanoString LST assay különböző fenotípust határozott meg (14B. ábra).

		IHC				IHC	
		non-GCB	GCB			non-GCB	GCB
LST	PCNSL			SCNSL			
	ABC	61	1	ABC	7	1	
	GCB	7	3	GCB	1	8	
	UC	5	na				

**14. ábra.** A Hans algoritmussal (IHC) és a NanoString LST-vel (LST) meghatározott sejteredet a PCNSL és a SCNSL esetekben. Míg PCNSL esetén 17%-ban különbözött a két módszerrel meghatározott fenotípus (14A. ábra), addig SCNSL esetén 11,5% volt különbség (14B. ábra).  
 Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; LST: lymphoma subtyping test; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma; UC: „unclassified”.

Eredményeink alapján látható, hogy a PCNSL esetek kisebb hányada bizonyult ABC fenotípusúnak a NanoString LST alkalmazásával, szemben a hagyományos Hans algoritmushoz képest (80,5% vs. 95%,  $p=0,022$ ). A 94 agyi lymphomában kétféle módszerrel meghatározott sejteredet és a génexpresszió mérés eredményei a 15. ábrán láthatóak.

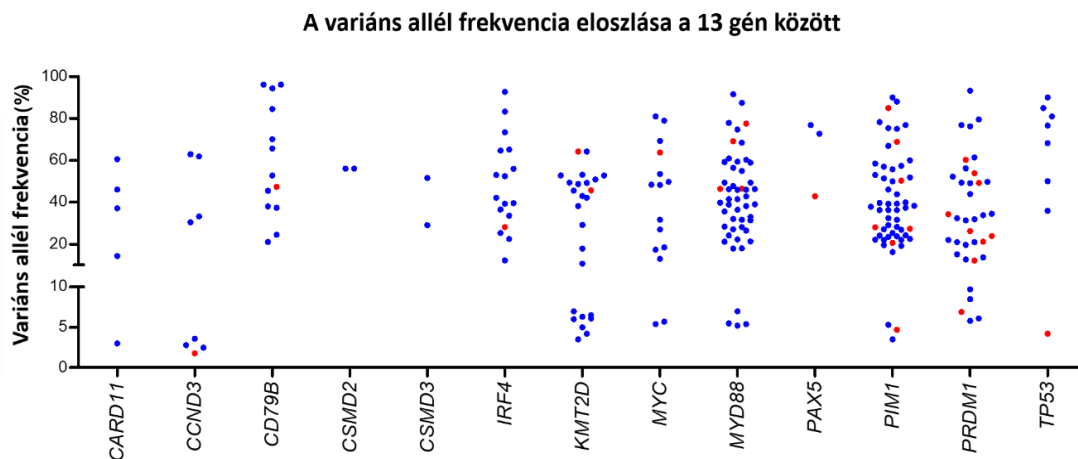


**15. ábra.** A NanoString LST assay eredményei. A hőtérképen 15 gén expresszió vizsgálata látható a 94 agyi lymphoma esetben. A felső 7 gén overexpressziója GCB fenotípusban, míg az alsó 8 gén overexpressziója ABC fenotípus esetén jellemző. A relatív mRNS expressziót színskálán jelöltük, világoszöld színnel a leggyengébb expresszió, míg világospiros színnel a legerősebb expresszió látható. Az LST assay eredményeit összehasonlítottuk a Hans féle IHC algoritmussal meghatározott sejteredet eredményeivel. *Rövidítések:* ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; LST: lymphoma subtyping test; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma.

## 2. DNS alapú vizsgálatok

### 2.1. Az NGS vizsgálat eredményei

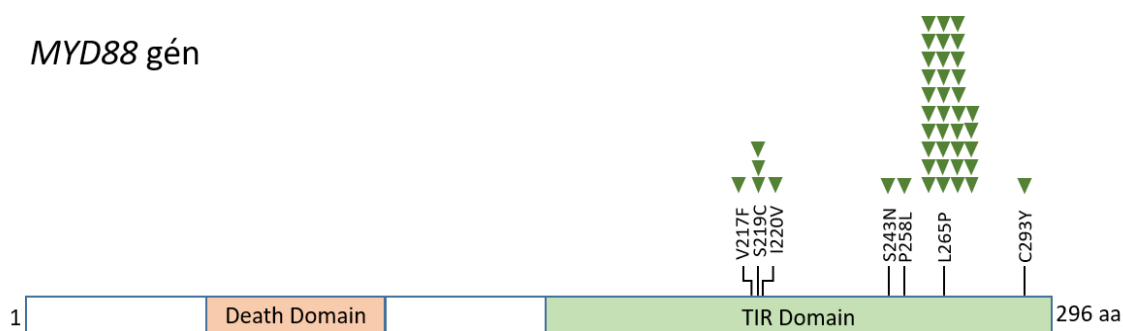
A 14 gén célzott NGS analízise során a 76 központi idegrendszeri lymphoma mintában összesen 239 mutációt azonosítottuk. Az átlagos variáns allél frekvencia (VAF) 41,4% (1,8%-96,2%) volt. A mutációk 81%-ában (194/239) a VAF >20%-nak bizonyult. A VAF-ok eloszlása az érintett gének esetében a 16. ábrán látható. A vizsgálatunkban azonosított összes mutáció a Függelék 1. táblázatában található.



**16. ábra.** Az azonosított szomatikus mutációk génenkénti variáns allélfrekvencia eloszlása. Egy pont, egy mutációt jelöl. Kékkel a PCNSL, míg pirossal a SCNSL esetekben azonosított mutációkat ábrázoltuk. A *PTPRD* génben egy mutációt sem detektáltunk, az ábrán ezt a gént nem jelöltük.

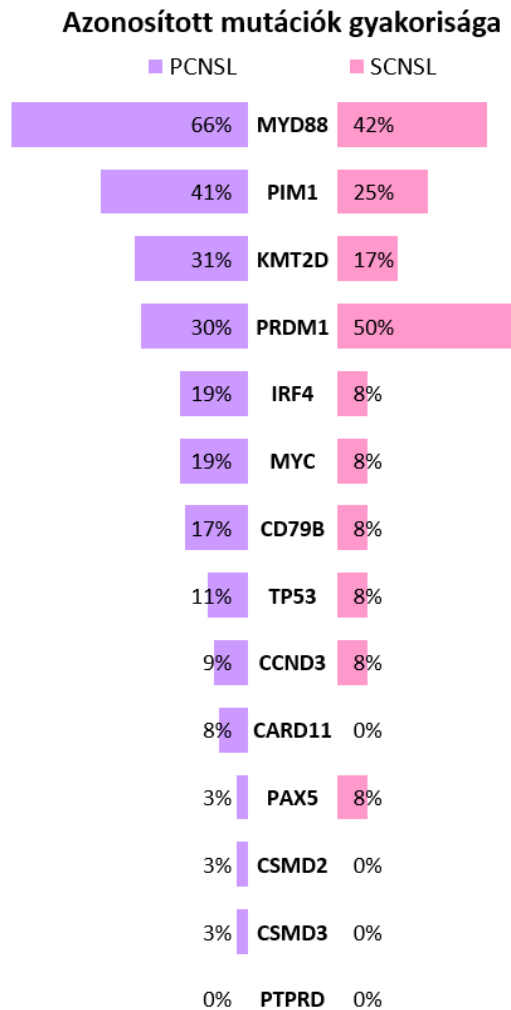
A vizsgálatba bevont 64 PCNSL esetünkben összesen 210 szomatikus mutációt detektáltunk a 14 vizsgált génben. Átlagosan betegenként 3,3 mutáció (0-10) volt megfigyelhető. A mutációk típus szerinti megoszlása a következőképp alakult: missense mutáció: 75,2% (158/210), az 5 vagy a 3 prime UTR régió mutációi: 11,4% (24/210), splice régió mutációi: 7,6% (16/210), in frame deléción: 3,3% (7/210), frameshift mutáció: 1,9% (4/210) és nonsense mutáció: 0,5% (1/210). Esetenként a mutációk átlagosan 2,6 gént (0-5) érintettek. Vizsgálatunk során a leggyakoribb mutációs

célpontokat a *MYD88* (66%) (17. ábra), a *PIMI* (41%), a *KMT2D* (31%) és a *PRDMI* (30%) génekben azonosítottunk. A további génekben a következőképpen alakultak a mutációs gyakoriságok: *C-MYC* (19%), *IRF4* (19%), *CD79B* (17%), *TP53* (11%), *CCND3* (9%), *CARD11* (8%), *PAX5* (3%), *CSMD2* (3%) és *CSMD3* (3%). A *PTPRD* génben nem detektáltunk mutációt.



**17. ábra.** PCNSL-ben a leggyakoribb mutáció a *MYD88* gént érintette, az esetek 66%-ában. Az ábrán a *MYD88* gén vázlatos domén szerkezete és a detektált missense mutációk láthatóak. Az ábrán minden zöld háromszög egy eltérést jelöl. *Rövidítések:* aa: aminosav; C: cisztein; F: fenilalanin; I: izoleucin; L: leucin; N: aszparagin; P: prolin; S: szerin; TIR: Toll/interleukin-1 receptor; V: valin; Y: tirozin.

A 12 SCNSL esetben összesen 29 szomatikus mutációt találtunk, átlagosan 2,4 mutáció/eset (0-5) gyakorisággal. A mutációk típus szerinti megoszlása a következő volt: missense mutáció: 72,4% (21/29), az 5 vagy a 3 prime UTR régió mutációi: 20,7% (6/29), frameshift mutációk: 3,5% (1/29) és a splice régió mutációi: 3,5% (1/29). Esetenként átlagosan 1,8 génben (0-4) azonosítottunk mutációt. A leggyakoribb mutációkat a *PRDMI* (50%), a *MYD88* (42%) és a *PIMI* (25%) génekben azonosítottuk. A többi génben alacsonyabb mutációs gyakoriság volt megfigyelhető: *KMT2D* (17%), *CD79B* (8%), *IRF4* (8%), *CCND3* (8%), *C-MYC* (8%), *TP53* (8%) és *PAX5* (8%). A *CARD11*, a *CSMD2*, a *CSMD3* és a *PTPRD* génekben nem azonosítottunk mutációkat (18. ábra).



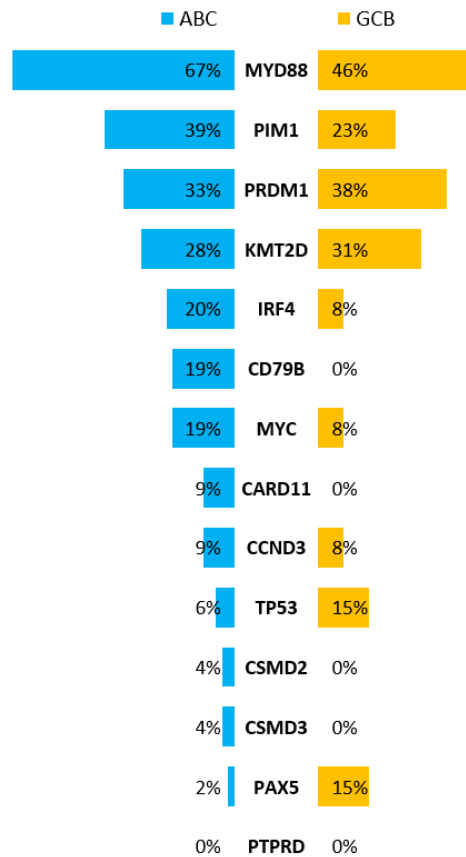
**18. ábra.** A vizsgált génekben azonosított mutációk gyakorisága PCNSL és SCNSL esetekben. A PCNSL és SCNSL esetekben egyaránt a *MYD88*, a *PIM1*, a *KMT2D* és a *PRDM1* génekben azonosítottunk leggyakrabban mutációkat. *Rövidítések: PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma.*

## 2.2. A mutációs profil és a sejteredet korrelációja

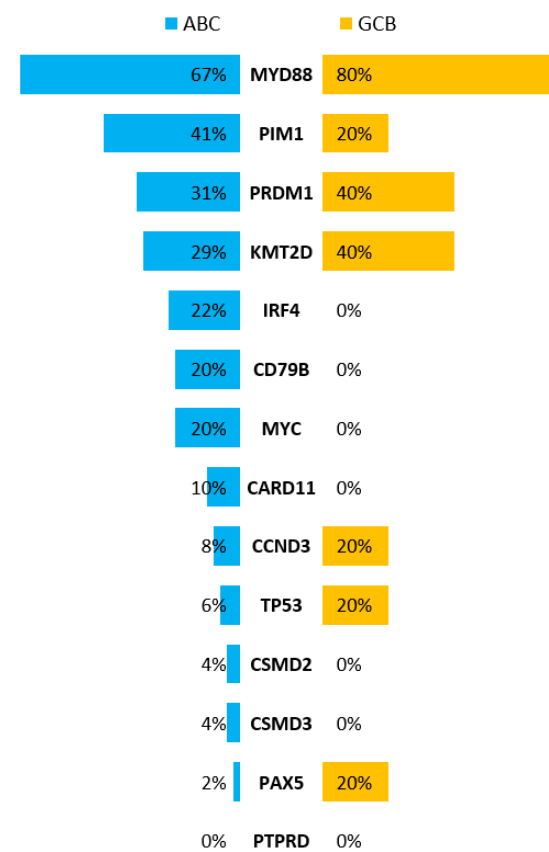
Az összes agyi lymphoma esetben a mutációk előfordulását a sejteredettel összevetve, azt tapasztaltuk, hogy az ABC fenotípusú esetekben a *MYD88* (67% vs 46%), a *PIMI* (39% vs 23%), az *IRF4* (20% vs 8%) és a *C-MYC* (19% vs 8%) gének gyakrabban hordoztak mutációkat szemben a GCB esetekkel. Kizárólag az ABC fenotípusú esetekben figyeltük meg a *CD79B* (19%), a *CARD11* (9%), a *CSMD2* (4%) és a *CSMD3* (4%) gének mutációit. Ezzel szemben a *TP53* (15% vs 6%) és a *PAX5* (15% vs 2%) génekben gyakrabban detektáltunk mutációkat GCB fenotípusú esetekben az ABC fenotípushoz képest. Míg a *PRDMI*, a *KMT2D* és a *CCND3* gének gyakorisága közel egyező volt a különböző molekuláris szubtípusú esetekben.

A PCNSL eseteket külön elemezve, az ABC fenotípus esetén a gyakrabban fordult elő a *PIMI* (41% vs 20%) mutációja. Kizárólag az ABC fenotípusú esetekben azonosítottuk az *IRF4* (22%), a *CD79B* (20%), a *C-MYC* (20%), a *CARD11* (10%), a *CSMD2* (4%) és a *CSMD3* (4%) gének mutációit. A GCB szubtípusú PCNSL esetekben a *TP53* (20% vs 6%), a *PAX5* (20% vs 2%), és a *CCND3* (20% vs 8%) gének mutációi voltak gyakoribbak (19. ábra). Bár a mutációs frekvenciák közötti különbség a két molekuláris alcsoportban nem érte el a szignifikáns szintet, több gén esetén figyeltük meg egy-egy gén gyakoribb mutációit, illetve kizárólagos eltéréseit ABC vagy GCB fenotípus esetén (19. ábra). A mutációs profil és a sejteredet vizsgálat eredményeinek eset-szintű összefoglalása a 20. ábrán látható.

Mutációs frekvencia az összes agyi lymphoma esetben

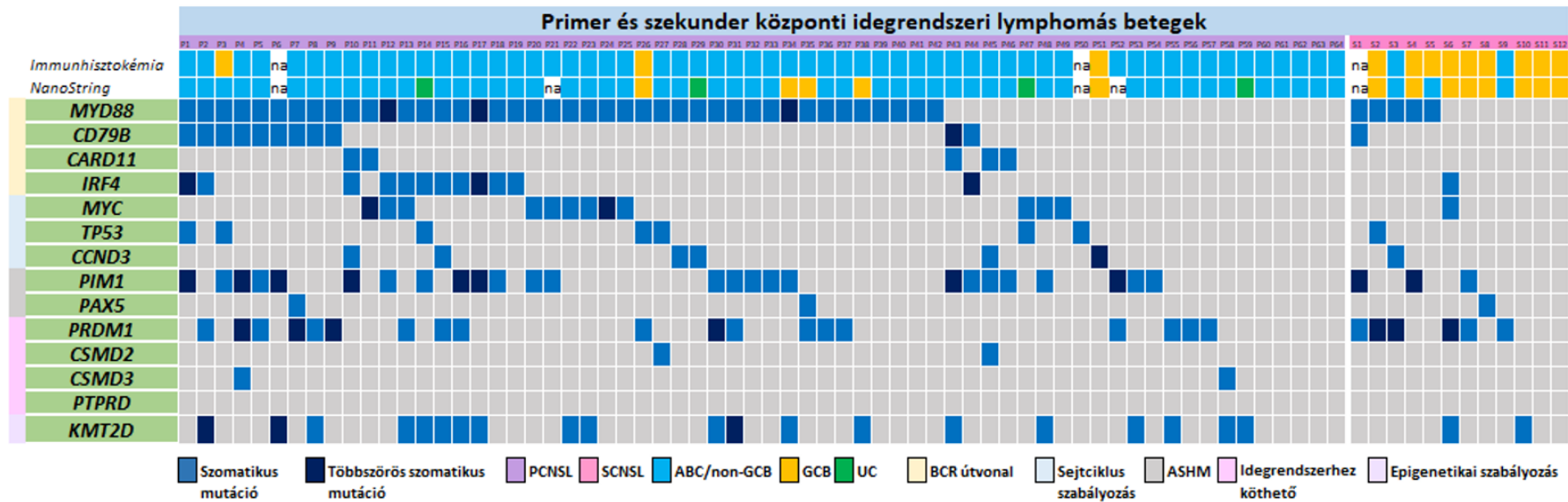


Mutációs frekvencia a PCNSL esetekben



**19. ábra.** A mutációs frekvencia a NanoString LST assay-vel meghatározott sejteredet szerinti megoszlása az összes agyi lymphoma és a PCNSL esetekben. *Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma.*

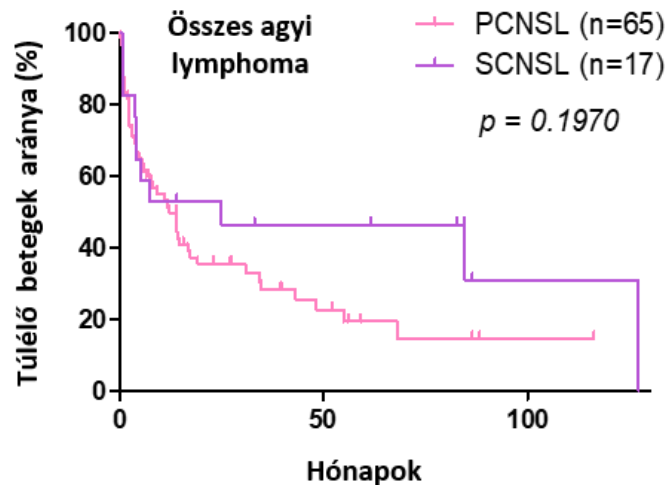




**20. ábra.** A hőtérképen a 64 PCNSL és a 12 SCNSL eset mutációs mintázata, és a kétféle módszerrel (NanoString LST és Hans- féle immunhisztokémia) meghatározott sejteredet hőtérképszerű megjelenítése. Egy függőleges oszlop, egy beteget jelöl. Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; ASHM: aberráns szomatikus hipermutáció; BCR: B-sejt receptor; GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; IHC: immunhisztokémia; non-GCB: nem centrum germinatívum B-sejtes eredet; P/PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma esetek; S/SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma esetek.

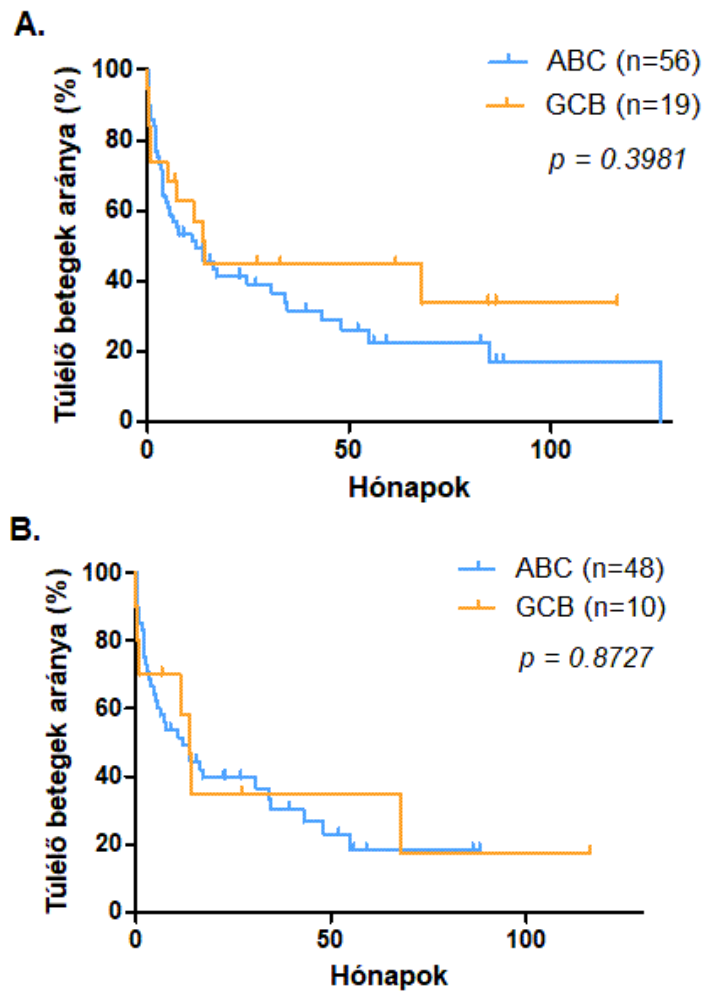
### 3. A sejteredet és a mutációs profil összefüggéseinek vizsgálata a túléléssel

A PCNSL és SCNSL betegek túlélése között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget ( $p=0,1970$ ) (21. ábra).



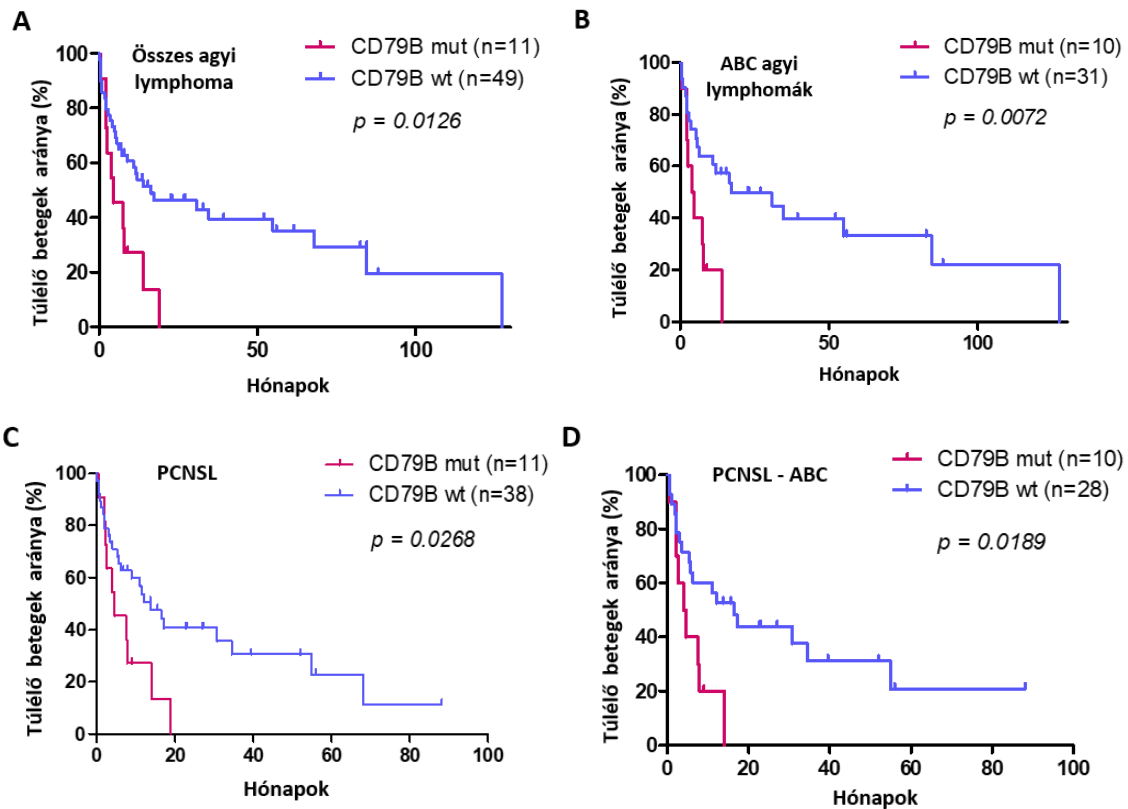
**21. ábra.** A túlélő betegek aránya az összes agyi lymphoma esetben. Nem találtunk szignifikáns különbséget a túlélésben primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák esetén. *Rövidítés: PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; SCNSL: szekunder központi idegrendszeri lymphoma.*

Vizsgálatunkban, meglepően, a sejteredetnek nem volt hatása a túlélésre: nem volt szignifikáns különbség sem az összes agyi lymphoma esetben ( $p=0,3981$ ) (22A. ábra), sem a PCNSL eseteket nézve ( $p=0,8727$ ) (22B. ábra). Ennek háttérében az alacsony esetszám mellett az állhat, hogy a vizsgálatunkba bevont betegek esetében heterogén terápiás protokollokat alkalmaztak.



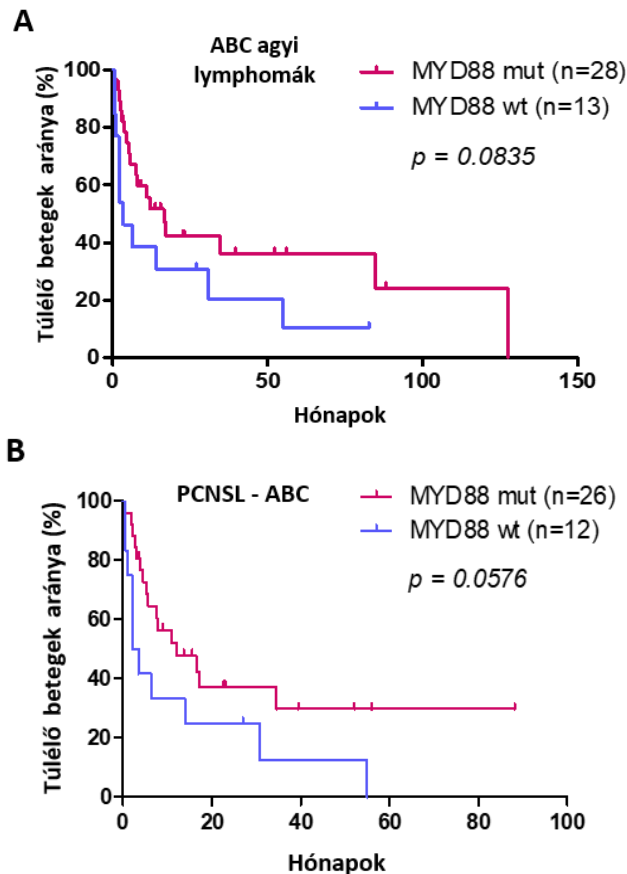
**22. ábra.** A túlélő betegek aránya a NanoSting LST-vel meghatározott sejteredet szerint. Nem találtunk szignifikáns eltérést a túlélésben az ABC és GCB fenotípusú esetekben sem az összes agyi lymphomát vizsgálva (22A. ábra), sem a PCNSL eseteket külön nézve (22B. ábra). Rövidítések: ABC: *aktivált B sejtjes eredet*; GCB: *centrum germinatívum B-sejtjes eredet*; PCNSL: *primer központi idegrendszeri lymphoma*.

A *CD79B* mutációt hordozó esetekben szignifikánsan rövidebb OS volt megfigyelhető az összes agyi lymphomában ( $p=0,0126$ ) (23A. ábra), az összes ABC fenotípusú lymphomában ( $p=0,0072$ ) (23B. ábra), a PCNSL esetekben ( $p=0,0268$ ) (23C. ábra) és az ABC fenotípusú PCNSL esetekben is ( $p=0,0189$ ) (23D. ábra).



**23. ábra.** Túlélő betegek aránya a *CD79B* mutáció szerint. Szignifikánsan rosszabb túlélést figyeltünk meg a *CD79B* mutációt hordozó betegek között, mind az összes agyi lymphoma (23A. ábra) és az összes primer központi idegrendszeri lymphoma (23C. ábra) tekintetében. Sejteredet szerint az ABC fenotípus esetén járt a *CD79B* mutáció rosszabb túléléssel az összes agyi lymphoma (23B. ábra) és a primer központi idegrendszeri lymphoma (23D. ábra) esetekben. *Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; mut: mutáció; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; wt: vad típus.*

Ezzel szemben a *MYD88* mutáció esetén hosszabb OS-t dokumentáltunk az ABC fenotípusú PCNSL esetekben ( $p=0,0576$ ) (24A. ábra) és az összes ABC fenotípusú agyi lymphomában ( $p=0,0835$ ) (24B. ábra). A *CCND3* mutáció esetén kedvezőbb OS volt jellemző, az összes agyi lymphomában ( $p=0,0262$ ) és a PCNSL esetekben ( $p=0,0528$ ).



**24. ábra.** A túlélő betegek aránya a *MYD88* mutáció szerint. Az összes ABC fenotípusú agyi lymphoma (24A. ábra) és az ABC fenotípusú primer központi idegrendszeri lymphomák (24B. ábra) esetén is szignifikánsan jobb túlélést figyeltünk meg a *MYD88* mutációt hordozó esetekben. *Rövidítések: ABC: aktivált B-sejtes eredet; mut: mutáció; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma; wt: vad típus.*

Bár csak két PCNSL esetben azonosítottuk *CSMD3* mutációt, szignifikánsan rosszabb túlélést figyeltünk meg az összes agyi lymphoma ( $p=0,0038$ ), az összes ABC fenotípusú lymphoma ( $p=0,0034$ ), a PCNSL ( $p=0,0047$ ) és az ABC fenotípusú PCNSL esetén ( $p=0,0057$ ) is.

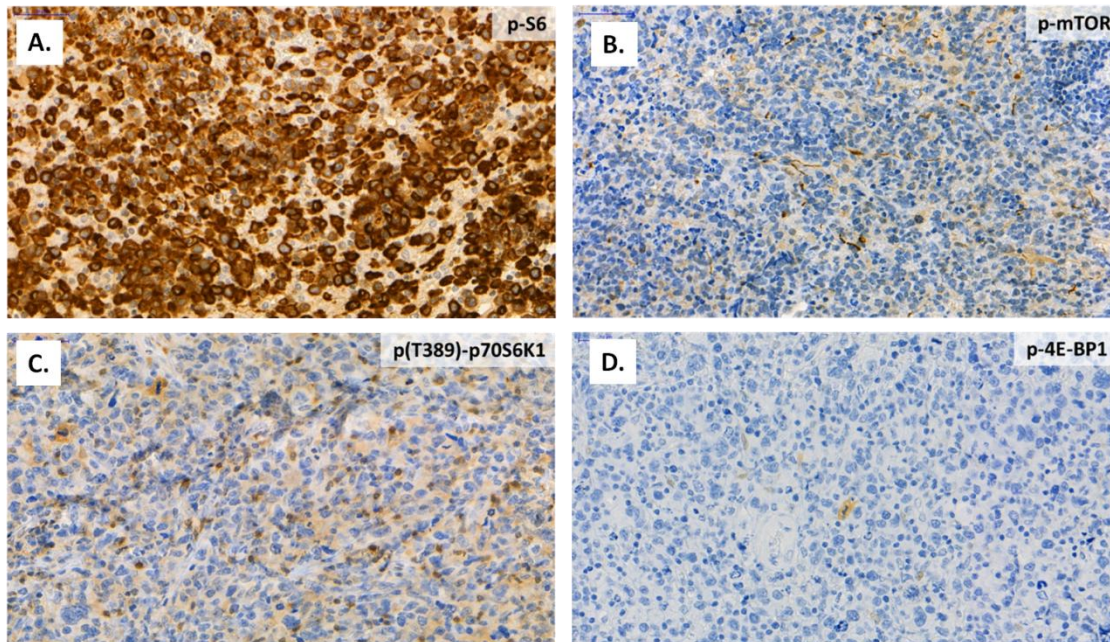
Tanulmányunkban kis esetszámú szekunder központi idegrendszeri lymphoma

esetet vizsgáltunk, így néha a mutációt hordozó esetek száma is alacsony. Tisztában vagyunk a leírt összefüggések limitációjával, ugyanakkor mivel korábban az SCNSL-ák mutációs profilját nem vizsgálták, fontosnak tartottuk ezen eredmények bemutatását is.

## 4. Fehérje alapú vizsgálatok

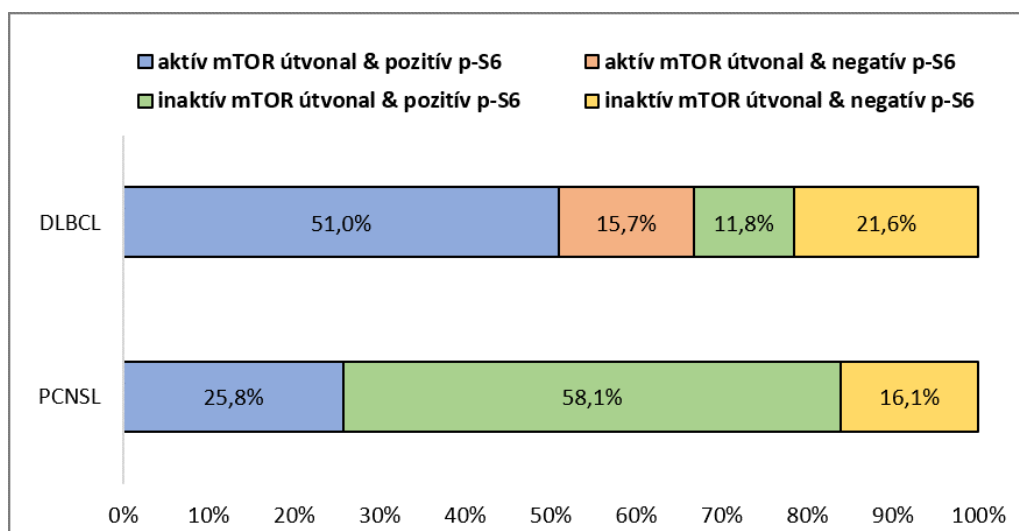
### 4.1. Az mTOR útvonal fehérjéinek expressziós vizsgálata

Immunhisztokémiai módszerrel a p-S6 expresszióját figyeltük meg a PCNSL esetek 83,9%-ában (26/31) és a DLBCL esetek 62,75%-ában (32/51). Ugyanakkor, míg a DLBCL esetén 54,9%-ban (28/51) detektáltunk p-mTOR expressziót, addig ezt PCNSL-ben csupán 12,9%-ban (4/31) tapasztaltuk. A p(T389)-p70S6K1 PCNSL-ben 6,5%-ban (2/31), DLBCL-ben 31,4%-ban (16/51) bizonyult pozitívnak. A p-4E-BP1 pozitív festődést mutatott a PCNSL esetek 12,9%-ban (4/31), DLBCL-ben pedig 29,4%-ban (15/51) (25. ábra).



**25. ábra.** A PCNSL mTOR aktivitásának IHC vizsgálata. A PCNSL esetek 83,9%-ában erős p-S6 pozitívítást láttunk (A). Azonban az esetek nagyrésztében a p-mTOR, a p(T389)-p70S6K és a p-4E-BP1 (B-D) expresszió nem jellemző a tumorsejtekre, ugyanakkor pozitív festődést láttunk a reaktív astrocytáknak, mitotikus alakokban vagy a reaktív lymphocytáknak (400x nagyítás). Rövidítés: 4-EB-P1: 4E-kötő fehérje 1; mTOR: mammalian target of rapamycin; p: foszforilált; p70S6K1: p70 riboszomális S6 kináz1.

A dolgozat 4.2. fejezetében (Módszerek rész) ismertetett kritériumok szerint, az mTOR útvonal aktivitásában szignifikáns ( $p < 0.001$ ) különbséget találtunk a PCNSL és DLBCL esetek között. Míg PCNSL-ben az esetek 25,8%-ában (8/31), addig DLBCL-ben 66,7%-ban (34/51) volt megfigyelhető aktív mTOR útvonal. PCNSL-ben az összes (100%, 8/8) mTOR aktív esetet p-S6 pozitivitás jellemezte, DLBCL-ben viszont 15,7%-ban (8/51) aktív mTOR útvonal mellett nem találtunk p-S6 expressziót. Érdekes módon az mTOR inaktív PCNSL esetek 78,3%-ában (18/23) erős p-S6 expressziót láttunk, míg DLBCL-ben az mTOR inaktív esetekben csak 35,3%-ában (6/17) találtunk p-S6 expressziót (26. ábra). Ezek alapján felmerült, hogy PCNSL-ben a p-S6 pozitivitás nem feltétlenül az mTOR útvonal aktivitásának köszönhető, és az S6 fehérje foszforilációja mTOR független módon történik.

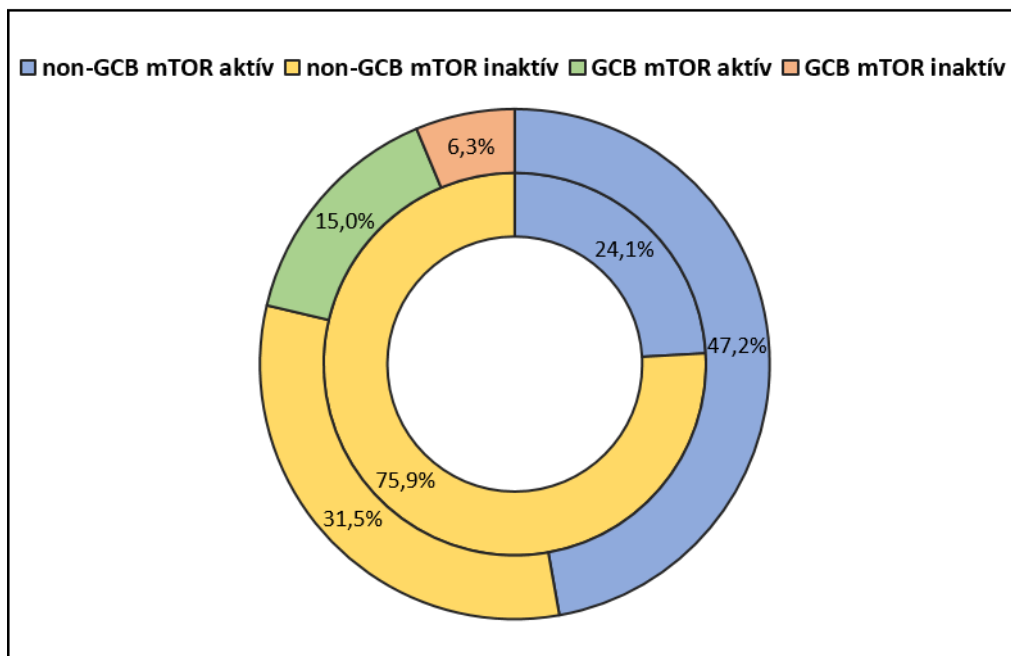


**26. ábra.** A PCNSL és DLBCL esetek eloszlása az mTOR aktivitás és a p-S6 expresszió függvényében. Látható, hogy mind a DLBCL, mind a PCNSL esetek nagyrészt p-S6 expressziót detektáltak. Azonban míg DLBCL-ben ez az esetek közel felében aktív mTOR útvonal mellett jellemző, addig PCNSL-ben a p-S6 expressziót döntően mTOR inaktív esetekben találtak. Rövidítések: DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma; mTOR: mammalian target of rapamycin; p: foszforilált; PCNSL: primer központi idegrendszeri lymphoma.



#### 4.2. Az mTOR útvonal aktivitásának és a sejteredet összefüggésének vizsgálata

A fehérje szintű tanulmányainkban vizsgált DLBCL esetek 78,7%-a (37/47) non-GCB fenotípusú volt, amelyek 70,3%-a (26/37) mTOR útvonal aktívnak bizonyult. A GCB fenotípusú (21,3%, 10/47) DLBCL-ek 60%-át találtuk mTOR aktívnak. Az összes vizsgált PCNSL-ben (29/29) az non-GCB fenotípusra jellemző expressziót láttuk, tehát valamennyi mTOR aktív PCNSL eset non-GCB szubtypusba tartozott (24,1%, 7/29). Az mTOR útvonal aktivitása akkor is szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) gyakoribb volt DLBCL-ben, mint PCNSL-ben, ha csak az non-GCB-DLBCL eseteket vizsgálatuk (27. ábra).



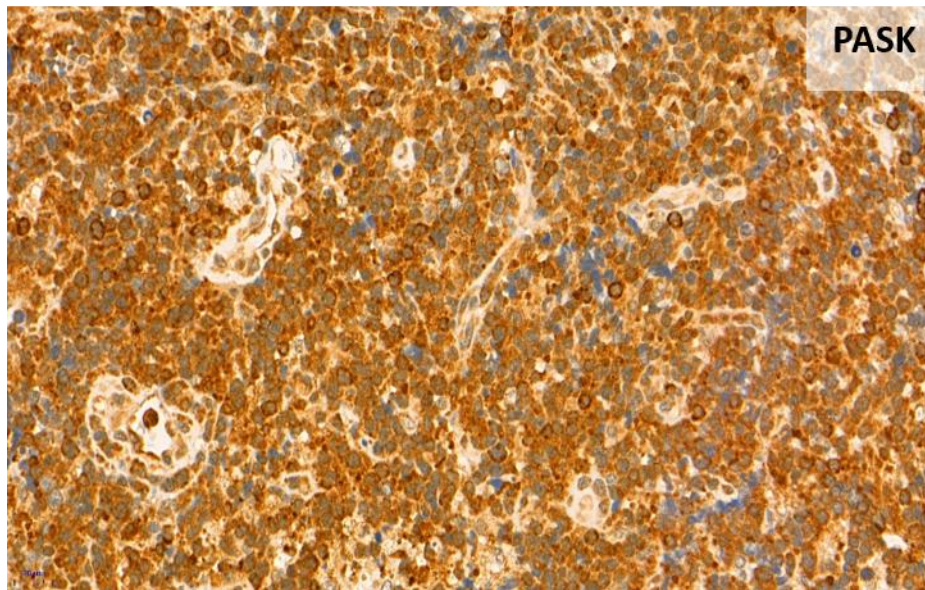
**27. ábra.** Az mTOR útvonal aktivitás és a sejteredet összefüggése PCNSL-ben és DLBCL-ben. A legtöbb DLBCL eset (külső kör) non-GCB fenotípusú volt, aktív mTOR útvonal mellett. Az összes PCNSL eset (belső kör) non-GCB fenotípusú volt, csupán 24,1%-ban figyeltünk meg mTOR aktivitást. Rövidítések: GCB: centrum germinatívum B-sejtes eredet; mTOR: mammalian target of rapamycin; non-GCB: nem centrum germinatív B-sejtes eredet.

### 4.3. Az mTOR független kinázok vizsgálata PCNSL-ben

A PCNSL esetek 3%-a (1/31) bizonyult p-RSK pozitívnak, míg a p(T229)-p70S6K1 expresszióját vizsgálva egy esetben sem (0%, 0/31) láttunk pozitív reakciót, ami arra utal, hogy az mTOR független kinázok valószínűleg nem játszanak szerepet a S6 foszforilációjában PCNSL-ben.

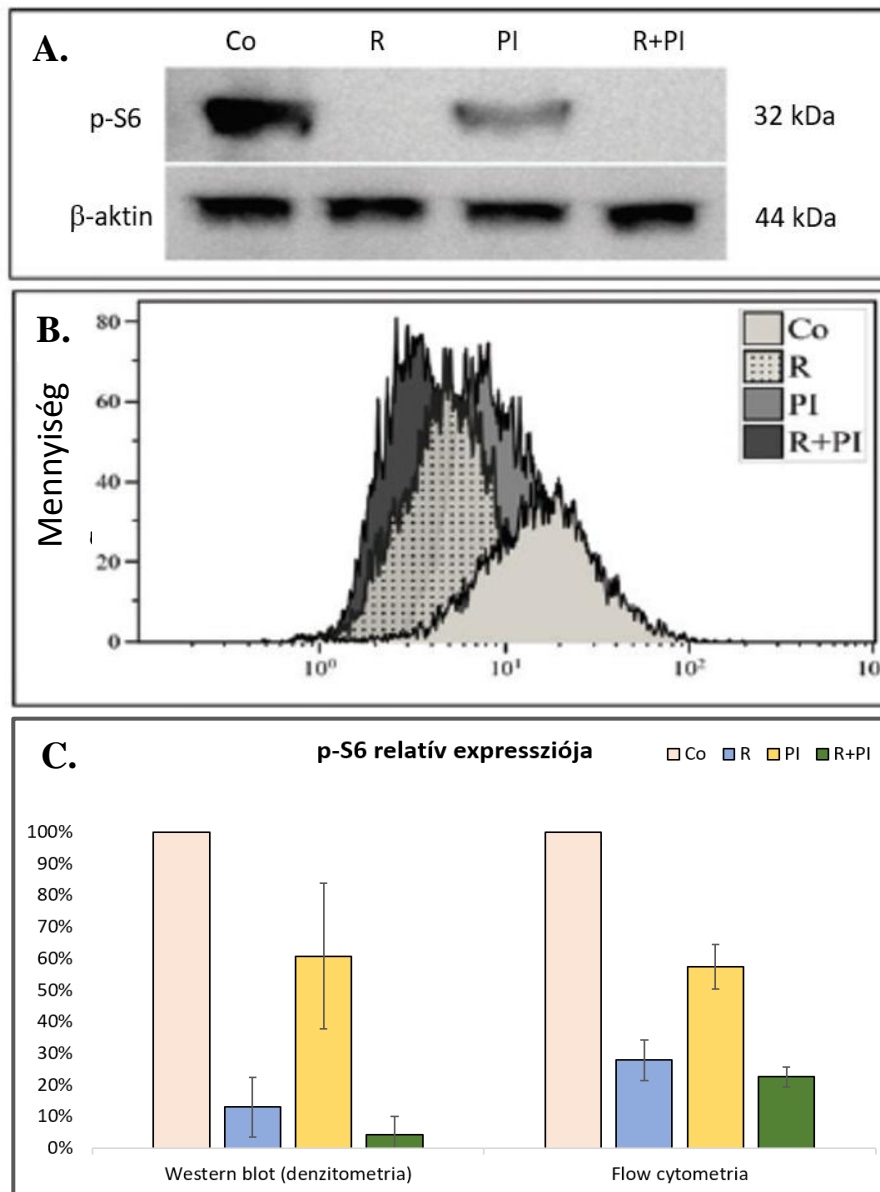
### 4.4. A PASK expresszió vizsgálata PCNSL-ben és DLBCL-ben

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a PASK *in vitro* és *in vivo* is foszforilálhatja az S6 fehérjét [119], ezért FFPE mintákon vizsgáltuk a PASK expressziót is. Valamennyi PCNSL eset (100%, 26/26), amelyből elegendő minta állt a rendelkezésünkre, erős PASK pozitivitást mutatott. Hasonló erős PASK expressziót azonosítottunk DLBCL esetében is (100%, 51/51). (28. ábra).



**28. ábra.** A PCNSL PASK expressziójának IHC vizsgálata. Erős PASK festődést mutat gyakorlatilag a tumorsejtek 100%-a PCNSL-ben (400x nagyítás) Rövidítés: PASK: „PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase”.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a PASK szerepet játszhat-e az S6 fehérje foszforilálásában PCNSL-ben és DLBCL-ben. Ezekhez a vizsgálatokhoz egy olyan DLBCL sejtvonalat (BHD1) használtunk, melyben az S6 foszforilációja mTOR függő módon történik. A sejteket PASK inhibitorral kezeltük, majd mértük a p-S6 expresszió változását Western blottal és flow cytometriával. Pozitív kontrollként mTOR inhibitor rapamycint használtunk. A PASK inhibitor kezelés hatására jelentősen csökkent a p-S6 szint Western blottal és flow cytometriával mérve. Denzitometriával vizsgálva a blottokat a p-S6 expresszió 61%-ra csökkent a kezelés hatására a negatív kontrollhoz képest. Hasonló eredményt kaptunk flow cytometriával is, a p-S6 X-középértéke 57%-ra csökkent a PASK inhibitorral kezelt sejtekben. Ahogy vártuk, a rapamycin is szignifikánsan csökkentette a p-S6 szintet, denzitometriával mérve 13%-ra, míg flow cytometriával 28%-ra. A legkifejezettebb p-S6 szint változást a két gátlószer kombinációjakor láttuk: míg denzitometriával 4%-ra, addig flow cytometriával 23%-ra csökkent az expresszió mértéke a negatív kontrollhoz viszonyítva. A bemutatott eredmények két független vizsgálat értékeinek átlagát szemléltetik (29. ábra).



**29. ábra.** A különböző kezelések hatása a p-S6 expresszióra. Látható, hogy a rapamycin (mTOR gátló), a PASK inhibitor és a kettő kombinációja is csökkentette a p-S6 expressziót a BHD1 sejtvonalban, mind western blottal (29A. ábra), mind flow cytometriával (29B. ábra) vizsgálva. A 29C. ábrán a különböző gátlószerek a p-S6 expresszióra kifejtett hatása látható a két módszerrel mérve. Az eredmények két független vizsgálat értékeinek átlagát mutatják. Rövidítések: Co: kontroll; kDa: kilodalton; p: foszforilált; PI: Pask inhibitor; R: rapamycin.

## V. MEGBESZÉLÉS

A primer központi idegrendszeri lymphomák kezelése még napjainkban is kihívásokkal terhelt, a betegség kimenetele kedvezőtlenebb, mint a szisztémás lymphomáké, ezért nagy szükség van új biomarkerek és új terápiás célpontok azonosítására. Ehhez nagymértékben hozzájárulhat a betegség genomikai hátterének pontosabb megismerése, aminek a mutációs profilon túl a génexpressziós sajátságokon alapuló sejteredet meghatározása is szerves része.

Jelen tanulmányunkban elsőként határoztuk meg primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák (PCNSL és SCNSL) sejteredetét NanoString LST assay segítségével. Ezenfelül vizsgáltuk a primer és szekunder agyi lymphomák genomikus profilját, mely során 14 potenciális, prognosztikus jelentőségű vagy terápiásan célozható gén új-generációs szekvenálását végeztük el. Továbbá, átfogó immunhisztokémiai vizsgálatunk során, az mTOR útvonal aktivitását demonstráltuk PCNSL-ben és DLBCL-ben, valamint felvetettük a PASK szerepét az S6 fehérje mTOR független foszforilálásában.

Már Alizadeh és munkatársai megfigyelése óta tudjuk, hogy szisztémás DLBCL esetén a molekuláris szubklassifikációnak fontos prognosztikai szerepe van [53]. Az utóbbi években egyre több adat áll a rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy szisztémás DLBCL-ben a terápia megválasztásában is jelentősége lehet a molekuláris szubtípusnak [77, 131, 132]. A fenotípus meghatározására az évek során számos módszert kidolgoztak: az arany standard GEP vizsgálat mellett, FFPE mintából is elvégezhető IHC algoritmusokat. Sajnos a különböző IHC vizsgálatokkal meghatározott sejteredet nem mutat 100%-os konkordanciát sem egymással [64], sem az arany standard GEP vizsgálatokkal [63, 133]. A korábbi közlemények szerint a legtöbb PCNSL esetnek immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálva, aktivált B-sejtes eredete van [20, 79, 80]. Ezzel szemben Montesinos-Rongen megfigyelései alapján, GEP vizsgálattal PCNSL-ben közel egyenlő eloszlás tapasztalható az ABC, a GCB és az unclassified szubtípusok között [78]. A közelmúltban bemutatott digitális génexpressziós vizsgálaton alapuló NanoString LST technológia segítségével FFPE mintákból is pontosan meghatározható a molekuláris szubtípus. A szisztémás DLBCL

esetén kiváló korrelációt mutatott az arany standard GEP vizsgálattal és a NanoString LST módszerrel meghatározott molekuláris szubcsoport [67].

Jelen tanulmányunkban, elsőként vizsgáltuk PCNSL és SCNSL esetekben a sejteredetet NanoString LST segítségével. Meglepő módon, NanoString LST-vel vizsgálva az esetek nagyobb hányada bizonyult GCB fenotípusúnak, összehasonlítva a hagyományos IHC módszerrel meghatározott eredményekkel (13% vs 5%), ami a korábbi irodalmi adatokhoz képest is magasabb arány [20, 79, 80, 134, 135]. Tekintve, hogy a NanoString LST assay megbízhatónak és pontosnak bizonyult a molekuláris szubtípus meghatározására [67], azt gondoljuk, hogy az ezzel a módszerrel megállapított szubtípus tükrözheti leghűbben a betegség valós biológiai hátterét. Érdekes módon, vizsgálatunkban a molekuláris fenotípus és a betegek túlélése között nem figyeltünk meg összefüggést. A szisztémás DLBCL-ek esetén több gyógyszer ismert, amelyek hatékonysága függ a molekuláris szubtípustól. ABC fenotípus esetén a proteoszoma inhibitor bortezomib, az immunmodulátor lenalidomid és a BTK gátló ibrutinib esetén figyeltek jobb terápiás eredményeket, míg GCB fenotípusú esetekben hiszton metiltanszferáz gátlás és a bcl2 gátlás tűnik vonzó terápiás célpontnak [77, 131, 132]. Ezzel szemben PCNSL-ben nem állnak rendelkezésünkre adatok a különböző terápiás modalitások és a molekuláris szubtípus közötti összefüggésekről.

Az utóbbi években az új-generációs szekvenálás elterjedésével, egyre több vizsgálatban tanulmányozták a PCNSL mutációs profilját is. Ezek a döntően kis esetszámú vizsgálatok megállapították, hogy a PCNSL mutációs aránya és profilja hasonlít a szisztémás DLBCL-hez, és a legtöbb eltérés a BCR/NF $\kappa$ B útvonalat érinti [87, 91, 92, 102-104, 107, 136, 137]. Jelen tanulmányunkban 14 potenciális gén mutációs profilját vizsgálatuk 64 PCNSL és 12 SCNSL esetben. Mind a primer, mind a szekunder lymphomában a leggyakoribb mutációkat a *MYD88*, a *PIMI*, a *KMT2D* és a *PRDM1* génekben figyeltünk meg. Ezek a mutációs frekvenciák hasonlóak az irodalmi adatokhoz, bár a korábbi tanulmányokban is heterogenitás figyelhető meg a mutációs gyakoriságokban [91, 102-104, 107, 136-139]. Ennek hátterében több tényező állhat: egyrészt a PCNSL-re jellemző nagyfokú molekuláris heterogenitás, másrészt az, hogy sok esetben különbözik a vizsgált minta típusa, a szekvenálási módszer és az alkalmazott bioinformatikai analízis. Vizsgálatunk során, az új-generációs szekvenáláshoz olyan módszert választottunk, amellyel lehetőség nyílt mindkét DNS

szál egymástól független szekvenálására. Csak azokat a szomatikus variánsokat tekintettük valódi eltérésnek, amelyek mindkét DNS szálon jelen voltak, mely precízebb és megbízhatóbb mutációanalízist tesz lehetővé.

Korábbi közleményekkel összhangban [91, 92, 102-104, 107, 136, 137, 139], leggyakrabban PCNSL esetén a *MYD88* (66%) génben detektáltunk mutációkat, míg SCNSL-ben az esetek 42%-ban azonosítottunk *MYD88* mutációt. Vizsgálatunkban nem találtunk eltérést a mutációk gyakorisága között a különböző molekuláris szubtypusokat tekintve. Ezzel szemben irodalmi adatok szisztémás DLBCL-ben *MYD88* mutációt az esetek mintegy 20-30%-ában írtak le, döntően ABC fenotípusú esetekben [140, 141]. További érdekes megfigyelés, hogy a szisztémás ABC-DLBCL-ben a BTK inhibitor, ibrutinib kezelés 37%-ban volt klinikailag hatásos, különösen a *MYD88* és *CD79B* együttes mutációját hordozó esetekben [142]. Ugyanakkor, Grommes és munkatársai, fázis I. klinikai vizsgálatukban, ibrutinibbel kezelt, relabált PCNSL betegek 77%-ában tapasztaltak klinikai választ, döntően a *MYD88* mutációt hordozó esetekben. Érdekes módon, a *MYD88* és a *CD79B* együttes mutáció esetén csak parciális választ figyeltek meg. Továbbá, progresszív lefolyást az ismert ibrutinib rezisztenciát okozó *CARD11* mutáció esetén láttak [35]. Jelen tanulmányunkban *CARD11* mutációt 11%-os gyakorisággal detektáltunk. Eredményeink alapján, Grommes és munkacsoportja megfigyeléseit figyelembe véve, az ibrutinib terápia hatékony lehetne, sejteredettől függetlenül, a betegek közel felében (46%, 35/76), azon esetekben, ahol a *MYD88* mutáció mellett sem *CARD11*, sem *CD79B* mutáció nem detektálható. Ezenfelül, Grommes és munkatársai azt is megfigyelték, hogy a *CD79B* mutációt hordozó PCNSL esetekben fokozott mTOR útvonal aktivitás jellemző, és *in vitro* kísérleteik alapján a BTK és a PI3K/mTOR útvonalak együttes gátlása javíthatja az ibrutinib terápia hatékonyságát a *CD79B* mutáció esetén [35].

A PIM1 egy szerin/threonin kináz, melynek fontos szerepe van sejtproliferáció és a túlélés szabályozásában. Fokozott PIM1 expressziót figyeltek meg számos daganatban, főként hematológiai malignitásokban [143]. Brault és munkatársai megállapították, hogy a fokozott PIM1 expresszió gyakori előrehaladott, non-GCB DLBCL-ben [144]. Egy további tanulmány megerősítette a PIM1 potenciális szerepét ABC-DLBCL-ben, sőt az ibrutinib rezisztenciával is kapcsolatba hozták a PIM1 expresszió növekedést. Elméletüket alátámasztotta *in vitro* kísérleteik során tett

megfigyelésük, ahol ibrutinib rezisztens sejtvonalakon a pan-PIM inhibitor és az ibrutinib kombinációjával a tumorsejt-növekedés csökkenése figyelhető meg [145].

Az elmúlt években világossá vált, hogy a tumorgenezishez az epigenetikai szabályozás károsodása is hozzájárulhat. Jelenleg is számos klinikai vizsgálat folyik az epigenetikai folyamatokat befolyásoló inhibitorokkal, így a célzott daganat terápiában fontos szerepe lehet a jövőben az epigenetikai terápiának is [146]. Morin és munkatársai megfigyelték, hogy a *KMT2D* génben, ami egy hiszton metiltranszferázt kódol, az FL esetek 89%-ában, míg DLBCL esetek 32% mutáció detektálható. Továbbá az azonosított szomatikus mutációk nagyrésze inaktíváló volt, ez alapján feltételezték, hogy a *KMT2D* gén tumorszuppresszor szerepet tölt be NHL-ban [49]. Vizsgálatunkban, a PCNSL esetek harmadában, míg az SCNSL esetek 17%-ban azonosítottunk mutációkat a *KMT2D* génben. Eredményünk összhangban van egy korábbi közleménnyel, ahol a PCNSL esetek 50%-ában mutattak ki mutációkat a *KMT2D* génben [137]. Ezen megfigyelések alapján a PCNSL-ben azonosítható epigenetikai eltérések akár új, potenciális terápiás lehetőséget jelenthetnek a közeljövőben.

A *PRDM1* fehérje egy transzkripció represszor, ami szükséges a normál B-sejt differenciációhoz [147]. Pasqualucci és munkacsoportja az ABC fenotípusú DLBCL esetén a *PRDM1* gén inaktivációját figyelték meg az esetek negyedében. Megfigyeléseik arra utalnak, hogy a *PRDM1* gén tumorszuppresszor szerepet tölt be szisztémás DLBCL-ben, és inaktivációja hozzájárulhat a lymphomagenézishez is [148]. Ezekre az eredményekre alapozva, Courts és munkatársai tanulmányukban PCNSL-ben vizsgálták a *PRDM1* gén eltéréseit. A PCNSL esetek 19%-ában találták a *PRDM1* gén mutációit, amely felveti a lehetőséget, hogy a *PRDM1* gén PCNSL-ben is tumorszuppresszorként funkcionál és károsodása elősegíti a lymphoma kialakulását [138]. Ezekkel a közleményekkel összhangban, tanulmányunkban a PCNSL esetek 30%-ában, míg az SCNSL esetek 50%-ában detektáltuk a *PRDM1* gén mutációit.

A központi idegrendszeri fejlődésben szerepet játszó gének mutációit kizárólag PCNSL esetekben figyeltük meg: 3%-ban a *CSMD2* és *CSMD3* gének esetén, míg a *PTPRD* génben nem detektálunk mutációt. Bár a vizsgálatunkban kisebb arányban azonosítottunk mutációt ezekben a génekben, mint korábban leírták [103], de annak a lehetőségét nem lehet kizárni, hogy ezen mutációk hozzájárulhatnak a lymphoma primer idegrendszeri kialakulásához.



Tanulmányunk eredményei alapján a primer agyi lymphomákban, az ABC és GCB fenotípusonként megfigyelhető mutációs mintázat különbözik a nodális DLBCL-ben ismerttől [145, 149, 150]. Kizárólag ABC fenotípusban azonosítottunk mutációkat a *CD79B*, a *CARD11*, a *CSMD2* és a *CSMD3* génekben, azonban a *MYD88*, a *PIMI* és a *KMT2D* gének esetén nem volt szignifikáns a mutációs frekvenciák között a különbség a két szubtypusban. Ez alátámaszthatja Fukumura és munkatársai hipotézisét, miszerint a PCNSL sejteredettől független, önálló klinikai entitást képez [107].

Jelen tanulmányunkban, nem figyeltünk meg különbséget az ösztülélésben a primer és a szekunder lymphomák között. Ismert, hogy szisztémás DLBCL-ben a GCB fenotípus jobb prognózissal jár [53, 66], érdekes módon, azonban vizsgálatunkban az agyi lymphomák esetén a sejteredet nem befolyásolta a túlélést. Ezzel szemben, a mutációk összefüggését a túléléssel vizsgálva, rosszabb túlélést figyeltünk meg a *CD79B* és a *CSMD3* mutációkat hordozó esetekben. Korábbi vizsgálatokban a *CD79B* mutációk jelenlétét már összefüggésbe hozták a rövidebb PFS-sel [137, 139], azonban a *CSMD3* mutációk prognosztikus szerepét PCNSL-ben korábban még nem írták le. A *CSMD3* az immunválasz folyamataiban és az agyfejlődésben vesz részt, habár a pontos funkciója és a potenciális terápiás szerepe még nem tisztázott.

Tanulmányunkban, az ABC fenotípusú PCNSL esetekben a *MYD88* mutáció jobb túléléssel járt együtt. Ezzel szemben, több vizsgálatban is a *MYD88* mutáció jelenlétét rossz prognózissal hozták összefüggésbe [137, 151], míg Zheng és munkatársai nem találtak kapcsolatot a *MYD88* mutáció és a túlélés között [139]. Kedvezőbb túlélést figyeltünk meg a *CCND3* mutációt hordozó agyi lymphomákban, elsőként felvetve ezen mutációk potenciális prognosztikai szerepét. A *CCND3* mutációi elősegítik a proliferációt Burkitt lymphomában és DLBCL-ben [152, 153], és kapcsolatba hozhatók az FLT3 inhibitorokkal szembeni rezisztenciával akut myeloid leukémiában [154]. Tisztában vagyunk azzal, hogy a betegek túlélésével kapcsolatos eredményeinket limitálja az alacsony esetszám, azonban tekintettel az ilyen típusú adat hiányára a szakirodalomban, ezen megfigyeléseinket is szeretnénk volna bemutatni.

Annak érdekében, hogy jobban megismerjük az mTOR útvonal aktivitását PCNSL-ben, átfogó immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink alapján felmerül, hogy a PCNSL csak mintegy negyedében aktív az mTOR útvonal. Grommes és munkatársai korábban már említett vizsgálatukban azt találták, hogy a

*CD79B* mutáció fokozott mTOR aktivitással jár [35]. Tanulmányunkban *CD79B* mutációt a PCNSL esetek 17%-ában detektáltunk, míg mTOR aktivitást az esetek 25,8%-ában. Bár a DNS szintű és fehérje szintű vizsgálatinkban nem ugyanazokat a mintákat használtuk, ez magyarázhatja az arányokban az eltérést, eredményeink hasonlóak Grommes és munkatársai megfigyeléséhez. Egy korábbi tanulmányban az mTORC1 útvonal aktivitását találták PCNSL esetek 80%-ában [129]. Ezen vizsgálat és saját tanulmányunk eltérő eredményének hátterében állhat az, hogy nincs egységes konszenzus arra vonatkozóan, hogy az mTOR útvonal aktivitásának meghatározásához, mely fehérjék expresszióját kell vizsgálni. Az említett közleményben az mTOR upstream szabályozójának, a Rheb-nek, illetve a downstream molekuláinak, a p-S6 és a p-4E-BP1 expresszióját határozták meg [129], azonban ezek a fehérjék mTOR független útvonalak aktivációját is jelezhetik [118, 119, 155-157]. Jelen tanulmányunkban számos fehérje expresszióját vizsgáltuk, köztük a p-mTOR és direkt downstream fehérjéjét, a p-p70S6K1-et. Azt is megfigyeltük, hogy PCNSL-ben gyakori, hogy p-S6 pozitivitás van, mTOR inaktivitás mellett. Ez arra utalhat, hogy az S6 fehérje szerepet játszik a PCNSL pathogenezisében, ugyanakkor felmerül, hogy mTOR független módon is történhet az aktivációja. Éppen ezért mTOR független fehérjék expresszióját is vizsgáltuk [112, 118-120, 158], melyek közül a PASK fehérje expresszióját az összes PCNSL esetben megfigyeltük. Összehasonlításképpen szisztémás DLBCL-ben is megvizsgáltuk a PASK expressziót, és hasonlóan a PCNSL esetekhez itt is erős pozitivitást detektáltunk. *In vitro* kísérletek alapján ismert, hogy a PASK foszforilálhatja az S6-ot egér embrionális fibroblastokon[119]. Felmerült a kérdés, vajon lymphomákban is szerepet játszhat-e a PASK az S6 fehérje foszforilálásában. A kérdés megválaszolásának érdekében PASK inhibitor kezelést végeztünk, egy DLBCL sejtvonalon (BHD1), melynek ismert tulajdonsága, hogy erős p-S6 expressziója mTOR függő módon történik [159]. A PASK gátlása szignifikáns p-S6 expresszió csökkenéshez vezetett, mely utalhat arra, hogy a PASK részt vesz lymphomákban a S6 foszforilációjában. A PASK egy tápanyag ellátottságot érzékelő szerin/treonin kináz [160, 161], amely fontos szerepet játszik emlősökben a glükóz homeosztázisban [162, 163], a lipid metabolizmusban [164, 165], és a fehérje transzlációban [119, 166]. Tekintve, hogy a PASK számos biológiai folyamatot irányíthat, ezért vonzó terápiás célpont lehet DLBCL-ben és PCNSL-ben is.

A primer központi idegrendszeri lymphomákban szenvedő betegek életkilátásai napjainkban is rosszabbak, mint a szisztémás DLBCL-es betegtársaiké. Az agyi lymphomák kezelésében a mai napig nincs konszenzus, ezért nagy szükség van új biomarkerek és potenciális terápiás célpontok azonosítására. Jelen tanulmányunkban, elsőként határoztuk meg PCNSL-ben és SCNSL-ben a sejteredetet NanoString LST assay segítségével. Megállapítottuk, hogy a korábban ismertekkel szemben, nagyobb arányban fordulnak elő GCB fenotípusú PCNSL esetek. Ezenfelül vizsgáltuk a primer és szekunder agyi lymphomák genomikus profilját, új-generációs szekvenálással. Megállapítottuk, hogy a *MYD88*, a *PIMI*, a *KMT2D* és a *PRDMI* gének mutációi gyakoriak agyi lymphomákban. Továbbá kimutattuk, hogy PCNSL-ben a fokozott p-S6 expresszió csak részben magyarázható az mTOR aktivitással, és felvetettük, hogy a PASK is szerepet játszhat az S6 foszforilálásában, mely a későbbiek során akár terápiás célpontként is szolgálhat.

Az elmúlt években ugrásszerűen nőttek az ismereteink a primer központi idegrendszeri lymphomák genetikai heterogenitásáról, és pathogeneziséről. Az új-generációs szekvenálás elterjedésével számos új prognosztikai markert és potenciális terápiás célpontot azonosítottak, amelyek megismerése elősegítheti a betegek személyre szabott terápiáját. Azonban ahhoz, hogy a PCNSL kezelésére hatékony terápiás protokollok születhessenek, és a betegség jobb megértése mellett a betegek kezelésében is előrelépést érjünk el, a közeljövőben nagy beteg anyag bevonásával megvalósuló, racionálisan tervezett klinikai vizsgálatok szükségesek.

## VI. KÖVETKEZTETÉSEK

- A primer központi idegrendszeri lymphomák molekuláris szubtipusa magasabb arányban bizonyult centrum germinatívum eredetűnek, mint korábban ismert volt.
- Meghatároztuk a primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák mutációs profilját. A PCNSL esetén a leggyakrabban mutált génnek a *MYD88* (66%) bizonyult, melyet a *PIMI* (41%), a *KMT2D* (31%) és a *PRDMI* (30%) gének eltérései követték. A leggyakrabban mutáció SCNSL esetén a *PRDMI* (50%) gént érintette, a *MYD88* (42%), a *PIMI* (25%) és a *KMT2D* (17%) mutációi mellett.
- A primer központi idegrendszeri lymphomák közül kizárólag az ABC fenotípus esetén fordult elő az *IRF4*, a *CD79B*, a *C-MYC*, a *CARD11*, a *CSMD2* és a *CSMD3* gének mutációja, míg GCB fenotípus esetén gyakoribbak a *TP53*, a *PAX5*, és a *CCND3* gének eltérései.
- Agyi lymphomák sejteredete nem mutatott összefüggést a túléléssel.
- A *CD79B* mutációk jelenléte kedvezőtlen kimenetellel társult agyi lymphomákban.
- A *MYD88* és a *CCND3* mutációk jelenléte kedvezőbb túléléssel járt együtt az összes agyi lymphoma és a primer központi idegrendszeri lymphoma esetekben is.
- PCNSL-ben az mTOR útvonal aktivitása nem jellemző, ugyanakkor fokozott p-S6 expresszió gyakran figyelhető meg, ami valószínűleg mTOR független módon történik.
- A PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase (PASK) feltehetően részt vesz az S6 fehérje foszforilálásában.

## VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A primer központi idegrendszeri lymphomák (PCNSL), ritka, agresszív extranodális non-Hodgkin lymphomák. Évek óta ismert, hogy szisztémás diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) esetén a tumorsejtek eredete alapján meghatározható molekuláris szubtípusnak prognosztikai és terápiás jelentősége is van. Ezzel szemben PCNSL sejteredetével kapcsolatosan ellentmondásos irodalmi adatok születtek. Az utóbbi években a PCNSL mutációs profiljának feltérképezése is megkezdődött, mely során a szisztémás DLBCL-hez hasonló mutációs mintázatot azonosítottak. Számos daganat típusban ismert, hogy a proliferációt, túlélést és növekedést szabályozó mTOR útvonal konstitutívan aktív. Az mTOR aktivitást PCNSL esetén korábban kevés kutatócsoport vizsgálta.

Jelen tanulmányunkban elsőként vizsgáltuk a PCNSL sejteredetét a digitális génexpresszió meghatározáson alapuló NanoString Lymphoma Subtyping Test (LST) technológia alkalmazásával. Emellett 14 visszatérő mutációt hordozó gén célzott újgenerációs újraszekvenálását végeztük el. Végül vizsgáltuk az mTOR útvonal aktivitását és foszforilációs viszonyait is PCNSL-ben

A PCNSL molekuláris szubtípusát vizsgálva, az esetek nagyobb hányadát találtuk GCB fenotípusúnak, mint korábban ismert volt. A PCNSL és SCNSL esetek mutációs profil meghatározása során megállapítottuk, hogy a leggyakrabban mutált géneknek a *MYD88*, a *PIM1*, a *KMT2D* és a *PRDM1* bizonyultak. Megfigyeltük, hogy az ABC fenotípusú PCNSL-ben gyakoribbak az *IRF4*, a *CD79B*, a *C-MYC*, a *CARD11*, a *CSMD2* és a *CSMD3* gének mutációi, míg a GCB fenotípus esetén a *TP53*, a *PAX5*, és a *CCND3* gének eltéréseit detektáltuk többször. Végezetül eredményeink szerint PCNSL-t az mTOR útvonal konstitutív aktivitása nem jellemzi, ugyanakkor fokozott p-S6 expressziót gyakran figyeltünk meg, ami valószínűleg a PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase (PASK) által, mTOR független módon történik.

Tanulmányunkban elsőként határoztuk meg NanoString LST módszerrel a sejteredetet PCNSL-ben, mely során magasabb arányban találtunk GCB fenotípusú eseteket, mint korábban ismert volt. Továbbá, kimutattuk, hogy PCNSL-ben az mTOR aktivitás nem jellemző, ugyanakkor a fokozott p-S6 expresszió hátterében, mTOR független módon, akár a PASK is állhat.

## VIII. SUMMARY

Primary central nervous system lymphomas (PCNSLs) are rare, aggressive non-Hodgkin lymphomas. It is well-known, that sub-classifying diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) into cell of origin (COO) categories has prognostic and potential therapeutic implications. In contrast, there are conflicting conclusions about the COO of PCNSL. The genomic profile of PCNSL has been analysed in the last few years, by various next-generation sequencing technologies. These studies revealed a similar mutational profile to that of the systemic DLBCL. In many cancer types, the constitutive activation of the mTOR pathway, which is a regulator of proliferation, survival and cell growth, can be observed. However, there is very limited data on mTOR pathway activity in PCNSL.

In this study, we applied, for the first time, the NanoString Lymphoma Subtyping Test (LST), a digital gene expression-based test to determine COO profiles of PCNSL patients. Furthermore, we performed targeted mutation profiling using 14 genes using ultradeep next-generation sequencing. Finally, we aimed to determine the mTOR pathway activity in PCNSL.

The COO profiling of PCNSL revealed a higher proportion of cases with a GCB subtype compared to previously published data in the literature. In both primary and secondary brain lymphoma cohorts, the most frequently mutated genes included *MYD88*, *PIM1*, *KMT2D* and *PRMD1*. In PCNSL, mutations of *IRF4*, *CD79B*, *MYC*, *CARD11*, *CSMD2* and *CSMD3* were observed exclusively in ABC cases, with mutations of *TP53*, *PAX5* and *CCND3* appearing more frequently in GCB subtype cases compared to the ABC cases. Based on our results, mTOR pathway is probably inactive in the majority of PCNSLs, while p-S6 expression is high. We demonstrated that PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase (PASK) may contribute to the mTOR independent phosphorylation of S6.

In summary, we successfully applied the NanoString LST-assay for molecular classification of PCNSL, reporting higher proportion of cases with GCB phenotype. Furthermore, we demonstrated, for the first time, an mTOR independent p-S6 activity in PCNSL and PASK may contribute to the phosphorylation of S6.

## IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Kluin PM, Deckert M, Ferry JA. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, (Editor), WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, 2008, 235-236.
2. Kluin PM, Deckert M, Ferry JA. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, (Editor), WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC, Lyon, 2017, 300-302.
3. Hoffman S, Propp JM, McCarthy BJ. (2006) Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999. *Neuro Oncol*, 8: 27-37.
4. Villano JL, Koshy M, Shaikh H, Dolecek TA, McCarthy BJ. (2011) Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. *Br J Cancer*, 105: 1414-1418.
5. Yu GH, Montone KT, Frias-Hidvegi D, Cajulis RS, Brody BA, Levy RM. (1996) Cytomorphology of primary CNS lymphoma: review of 23 cases and evidence for the role of EBV. *Diagn Cytopathol*, 14: 114-120.
6. Bashir R, McManus B, Cunningham C, Weisenburger D, Hochberg F. (1994) Detection of Eber-1 RNA in primary brain lymphomas in immunocompetent and immunocompromised patients. *J Neurooncol*, 20: 47-53.
7. Bashir R, Luka J, Cheloha K, Chamberlain M, Hochberg F. (1993) Expression of Epstein-Barr virus proteins in primary CNS lymphoma in AIDS patients. *Neurology*, 43: 2358-2362.
8. Patchell RA. (1988) Primary central nervous system lymphoma in the transplant patient. *Neurol Clin*, 6: 297-303.
9. Mahadevan A, Rao CR, Shanmugham M, Shankar SK. (2015) Primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma in the immunocompetent: Immunophenotypic subtypes and Epstein-Barr virus association. *J Neurosci Rural Pract*, 6: 8-14.
10. Citterio G, Reni M, Gatta G, Ferreri AJM. (2017) Primary central nervous

- system lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 113: 97-110.
11. Kuker W, Nagele T, Korfel A, Heckl S, Thiel E, Bamberg M, Weller M, Herrlinger U. (2005) Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. *J Neurooncol*, 72: 169-177.
  12. Balmaceda C, Gaynor JJ, Sun M, Gluck JT, DeAngelis LM. (1995) Leptomeningeal tumor in primary central nervous system lymphoma: recognition, significance, and implications. *Ann Neurol*, 38: 202-209.
  13. Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, Dunleavy K, Jaffe ES, Abati A, Stetler-Stevenson M, Wilson WH. (2005) High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*, 105: 496-502.
  14. Schroers R, Baraniskin A, Heute C, Kuhnhen J, Alekseyev A, Schmiegel W, Schlegel U, Pels HJ. (2010) Detection of free immunoglobulin light chains in cerebrospinal fluids of patients with central nervous system lymphomas. *Eur J Haematol*, 85: 236-242.
  15. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, Maghnouj A, Zollner H, Reinacher-Schick A, Schmiegel W, Hahn SA, Schroers R. (2011) Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*, 117: 3140-3146.
  16. Muniz C, Martin-Martin L, Lopez A, Sanchez-Gonzalez B, Salar A, Almeida J, Sancho JM, Ribera JM, Heras C, Penalver FJ, Gomez M, Gonzalez-Barca E, Alonso N, Navarro B, Olave T, Sala F, Conde E, Marquez JA, Cabezudo E, Cladera A, Garcia-Malo M, Caballero MD, Orfao A. (2014) Contribution of cerebrospinal fluid sCD19 levels to the detection of CNS lymphoma and its impact on disease outcome. *Blood*, 123: 1864-1869.
  17. Kuusisto ME, Haapasaari KM, Remes AM, Bloigu R, Karihtala P, Turpeenniemi-Hujanen T, Kuittinen O. (2015) Antithrombin III is probably not a suitable biomarker for diagnosis of primary central nervous system lymphoma. *Ann Hematol*, 94: 1167-1174.
  18. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao HX, Barajas R, Chen L, Josephson



- SA, Scott B, Douglas V, Maiti M, Kaplan LD, Treseler PA, Cha S, Hwang JH, Cinque P, Cyster JG, Lowell C. (2013) CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. *Blood*, 121: 4740-4748.
19. Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJ, Gospodarowicz M, Pulczynski EJ, Zucca E, Smith JR, Korfel A, Soussain C, DeAngelis LM, Neuwelt EA, O'Neill BP, Thiel E, Shenkier T, Graus F, van den Bent M, Seymour JF, Poortmans P, Armitage JO, Cavalli F. (2005) Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol*, 23: 5034-5043.
  20. Camilleri-Broet S, Criniere E, Broet P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, Kujas M, Raphael M, Iraqi W, Sautes-Fridman C, Colombat P, Hoang-Xuan K, Martin A. (2006) A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*, 107: 190-196.
  21. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, Calderoni A, Rossi A, Vavassori V, Conconi A, Devizzi L, Berger F, Ponzoni M, Borisch B, Tinguely M, Cerati M, Milani M, Orvieto E, Sanchez J, Chevreau C, Dell'Oro S, Zucca E, Cavalli F. (2003) Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol*, 21: 266-272.
  22. Abrey LE, Ben-Porat L, Panageas KS, Yahalom J, Berkey B, Curran W, Schultz C, Leibel S, Nelson D, Mehta M, DeAngelis LM. (2006) Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J Clin Oncol*, 24: 5711-5715.
  23. Han CH , Batchelor TT. (2017) Diagnosis and management of primary central nervous system lymphoma. *Cancer*, 123: 4314-4324.
  24. Gerstner ER, Carson KA, Grossman SA, Batchelor TT. (2008) Long-term outcome in PCNSL patients treated with high-dose methotrexate and deferred radiation. *Neurology*, 70: 401-402.
  25. Ferreri AJ, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, Torri V, Fox CP, Rosee PL, Schorb E, Ambrosetti A, Roth A, Hemmaway C, Ferrari A, Linton KM, Ruda R, Binder M, Pukrop T, Balzarotti M, Fabbri A, Johnson P,

- Gorlov JS, Hess G, Panse J, Pisani F, Tucci A, Stilgenbauer S, Hertenstein B, Keller U, Krause SW, Levis A, Schmoll HJ, Cavalli F, Finke J, Reni M, Zucca E, Illerhaus G. (2016) Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. *Lancet Haematol*, 3: e217-227.
26. Ferreri AJ, Reni M, Foppoli M, Martelli M, Pangalis GA, Frezzato M, Cabras MG, Fabbri A, Corazzelli G, Ilariucci F, Rossi G, Soffietti R, Stelitano C, Vallisa D, Zaja F, Zoppegno L, Aondio GM, Avvisati G, Balzarotti M, Brandes AA, Fajardo J, Gomez H, Guarini A, Pinotti G, Rigacci L, Uhlmann C, Picozzi P, Vezzulli P, Ponzoni M, Zucca E, Caligaris-Cappio F, Cavalli F. (2009) High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. *Lancet*, 374: 1512-1520.
27. Omuro A, Correa DD, DeAngelis LM, Moskowitz CH, Matasar MJ, Kaley TJ, Gavrilocic IT, Nolan C, Pentsova E, Grommes CC, Panageas KS, Baser RE, Faivre G, Abrey LE, Sauter CS. (2015) R-MPV followed by high-dose chemotherapy with TBC and autologous stem-cell transplant for newly diagnosed primary CNS lymphoma. *Blood*, 125: 1403-1410.
28. Omuro A, Taillandier L, Chinot O, Sierra Del Rio M, Carnin C, Barrie M, Soussain C, Tanguy ML, Choquet S, Leblond V, Hoang-Xuan K. (2011) Primary CNS lymphoma in patients younger than 60: can whole-brain radiotherapy be deferred? *J Neurooncol*, 104: 323-330.
29. Cai Q, Fang Y, Young KH. (2019) Primary Central Nervous System Lymphoma: Molecular Pathogenesis and Advances in Treatment. *Transl Oncol*, 12: 523-538.
30. Mendez JS, Ostrom QT, Gittleman H, Kruchko C, DeAngelis LM, Barnholtz-Sloan JS, Grommes C. (2018) The elderly left behind-changes in survival trends of primary central nervous system lymphoma over the past 4 decades. *Neuro Oncol*, 20: 687-694.
31. Rovira J, Valera A, Colomo L, Setoain X, Rodríguez S, Martínez-Trillos A, Giné E, Dlouhy I, Magnano L, Gaya A, Martínez D, Martínez A, Campo E, López-

- Guillermo A. (2015) Prognosis of patients with diffuse large B cell lymphoma not reaching complete response or relapsing after frontline chemotherapy or immunochemotherapy. *Ann Hematol*, 94: 803-812.
32. Sunshine J , Taube JM. (2015) PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 23: 32-38.
  33. Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, Mukundan S, Roemer MGM, Chapuy B, Armand P, Rodig SJ, Shipp MA. (2017) PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood*, 129: 3071-3073.
  34. Rubenstein JL, Fraser E, Formaker P, Lee JC-C, Chen N, Kock M, Cheung W, Wang X, Munster PN, Damato B. (2016) Phase I investigation of lenalidomide plus rituximab and outcomes of lenalidomide maintenance in recurrent CNS lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 34: 7502-7502.
  35. Grommes C, Pastore A, Palaskas N, Tang SS, Campos C, Schartz D, Codega P, Nichol D, Clark O, Hsieh WY, Rohle D, Rosenblum M, Viale A, Tabar VS, Brennan CW, Gavrilovic IT, Kaley TJ, Nolan CP, Omuro A, Pentsova E, Thomas AA, Tsyvkin E, Noy A, Palomba ML, Hamlin P, Sauter CS, Moskowitz CH, Wolfe J, Dogan A, Won M, Glass J, Peak S, Lallana EC, Hatzoglou V, Reiner AS, Gutin PH, Huse JT, Panageas KS, Graeber TG, Schultz N, DeAngelis LM, Mellingshoff IK. (2017) Ibrutinib Unmasks Critical Role of Bruton Tyrosine Kinase in Primary CNS Lymphoma. *Cancer Discov*, 7: 1018-1029.
  36. Lionakis MS, Dunleavy K, Roschewski M, Widemann BC, Butman JA, Schmitz R, Yang Y, Cole DE, Melani C, Higham CS, Desai JV, Ceribelli M, Chen L, Thomas CJ, Little RF, Gea-Banacloche J, Bhaumik S, Stetler-Stevenson M, Pittaluga S, Jaffe ES, Heiss J, Lucas N, Steinberg SM, Staudt LM, Wilson WH. (2017) Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma. *Cancer Cell*, 31: 833-843.e835.
  37. Korfel A, Schlegel U, Herrlinger U, Dreyling M, Schmidt C, von Baumgarten L, Pezzutto A, Grobosch T, Kebir S, Thiel E, Martus P, Kiewe P. (2016) Phase II Trial of Temsirolimus for Relapsed/Refractory Primary CNS Lymphoma. *J Clin Oncol*, 34: 1757-1763.
  38. Sun Y, Wang Y, Han S, Xing B, Li H, Zhu Y, Zhou S, Wang X, Xu J, Tao R.

- (2017) Efficacy and safety of pemetrexed on recurrent primary central nervous system lymphomas in China: a prospective study. *Onco Targets Ther*, 10: 2595-2600.
39. Han S, Wang M, Liu B, Yu J. (2016) Pemetrexed for primary central nervous system lymphoma in the elderly. *Clin Transl Oncol*, 18: 138-143.
  40. Zhao HT, Chen J, Shi SB, Tian J, Tao RJ. (2015) Pemetrexed plus rituximab as second-line treatment for primary central nervous system lymphoma. *Med Oncol*, 32: 351.
  41. Klapper W , Wacker HH. (2007) [Follicular and mantle cell lymphoma. Extranodal involvement of primarily nodal indolent B-cell lymphomas]. *Pathologe*, 28: 21-28.
  42. Villa D, Connors JM, Shenkier TN, Gascoyne RD, Sehn LH, Savage KJ. (2010) Incidence and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: the impact of the addition of rituximab to CHOP chemotherapy. *Ann Oncol*, 21: 1046-1052.
  43. Hollender A, Kvaloy S, Nome O, Skovlund E, Lote K, Holte H. (2002) Central nervous system involvement following diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma: a risk model. *Ann Oncol*, 13: 1099-1107.
  44. Salzburg J, Burkhardt B, Zimmermann M, Wachowski O, Woessmann W, Oschlies I, Klapper W, Wacker HH, Ludwig WD, Niggli F, Mann G, Gadner H, Riehm H, Schrappe M, Reiter A. (2007) Prevalence, clinical pattern, and outcome of CNS involvement in childhood and adolescent non-Hodgkin's lymphoma differ by non-Hodgkin's lymphoma subtype: a Berlin-Frankfurt-Munster Group Report. *J Clin Oncol*, 25: 3915-3922.
  45. Kridel R , Dietrich PY. (2011) Prevention of CNS relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Lancet Oncol*, 12: 1258-1266.
  46. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, Dalla-Favera R. (2001) Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412: 341-346.
  47. Reddy A, Zhang J, Davis NS, Moffitt AB, Love CL, Waldrop A, Leppa S, Pasanen A, Meriranta L, Karjalainen-Lindsberg ML, Norgaard P, Pedersen M, Gang AO, Hogdall E, Heavican TB, Lone W, Iqbal J, Qin Q, Li G, Kim SY,

- Healy J, Richards KL, Fedoriw Y, Bernal-Mizrachi L, Koff JL, Staton AD, Flowers CR, Paltiel O, Goldschmidt N, Calaminici M, Clear A, Gribben J, Nguyen E, Czader MB, Ondrejka SL, Collie A, Hsi ED, Tse E, Au-Yeung RKH, Kwong YL, Srivastava G, Choi WWL, Evens AM, Pilichowska M, Sengar M, Reddy N, Li S, Chadburn A, Gordon LI, Jaffe ES, Levy S, Rempel R, Tzeng T, Happ LE, Dave T, Rajagopalan D, Datta J, Dunson DB, Dave SS. (2017) Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*, 171: 481-494.e415.
48. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, Novak AJ, Dogan A, Ansell SM, Link BK, Zou L, Gould J, Saksena G, Stransky N, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Hernandez-Lemus E, Schwarz-Cruz y Celis A, Imaz-Rosshandler I, Ojesina AI, Jung J, Peadamallu CS, Lander ES, Habermann TM, Cerhan JR, Shipp MA, Getz G, Golub TR. (2012) Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 3879-3884.
49. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M, Jackman S, Krzywinski M, Scott DW, Trinh DL, Tamura-Wells J, Li S, Firme MR, Rogic S, Griffith M, Chan S, Yakovenko O, Meyer IM, Zhao EY, Smailus D, Moksa M, Chittaranjan S, Rimsza L, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Ben-Neriah S, Meissner B, Woolcock B, Boyle M, McDonald H, Tam A, Zhao Y, Delaney A, Zeng T, Tse K, Butterfield Y, Birol I, Holt R, Schein J, Horsman DE, Moore R, Jones SJ, Connors JM, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. (2011) Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, 476: 298-303.
50. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabadan R, Dalla-Favera R. (2011) Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*, 43: 830-837.
51. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, Dunphy C, Choi W, Au WY, Srivastava G, Lugar PL, Rizzieri DA, Lagoo AS,

- Bernal-Mizrachi L, Mann KP, Flowers C, Naresh K, Evens A, Gordon LL, Czader M, Gill JJ, Hsi ED, Liu Q, Fan A, Walsh K, Jima D, Smith LL, Johnson AJ, Byrd JC, Luftig MA, Ni T, Zhu J, Chadburn A, Levy S, Dunson D, Dave SS. (2013) Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 1398-1403.
52. Tomita N, Takasaki H, Fujisawa S, Miyashita K, Ogusa E, Kishimoto K, Matsuura S, Sakai R, Koharazawa H, Yamamoto W, Fujimaki K, Fujita H, Ishii Y, Taguchi J, Kuwabara H, Motomura S, Ishigatsubo Y. (2013) Standard R-CHOP therapy in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop*, 53: 121-125.
53. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, 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, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403: 503-511.
54. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M, Amini RM, Blomqvist C, Enblad G, Leppa S. (2007) Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood*, 109: 4930-4935.
55. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346: 1937-1947.
56. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ,

- Oudejans JJ. (2006) Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*, 208: 714-723.
57. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, Connors JM, Gratzinger D, Rosado M, Zhao S, Pohlman B, Wongchaowart N, Bast M, Avigdor A, Schiby G, Nagler A, Byrne GE, Levy R, Gascoyne RD, Lossos IS. (2008) LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol*, 26: 447-454.
58. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppa S. (2009) Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol*, 22: 1094-1101.
59. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, Tzankov A, Wen W, Liu WM, Kahl BS, d'Amore ES, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Tam W, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Winter JN, Wang HY, O'Neill S, Dunphy CH, Hsi ED, Zhao XF, Go RS, Choi WW, Zhou F, Czader M, Tong J, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Ai W, Etzell J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Piris MA, Moller MB, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ, Wu L, Young KH. (2012) Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*, 26: 2103-2113.
60. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, Braziel 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. (2009) A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*, 15: 5494-5502.
61. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO,

- Chan WC. (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103: 275-282.
62. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M, Hammer AS, Hamilton Dutoit S, Lossos IS, Levy R. (2007) The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood*, 109: 1636-1642.
63. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Campo E, Vose JM, Lenz G, Staudt LM, Chan WC, Weisenburger DD. (2011) Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*, 29: 200-207.
64. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, Alvarez R, Gomes da Silva M, Cabecadas J, Calaminici M, Gribben JG. (2013) Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*, 19: 6686-6695.
65. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM. (2008) Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 359: 2313-2323.
66. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. (2003) A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 9991-9996.
67. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, Rosenwald A, Campo E, Chan WC, Connors JM, Smeland EB, Mottok A, Braziel RM, Ott G, Delabie J, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Greiner TC, Glinnsman-



- Gibson BJ, Fu K, Staudt LM, Gascoyne RD, Rimsza LM. (2014) Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*, 123: 1214-1217.
68. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, Lynch JC, Armitage JO, Warnke RA, Alizadeh AA, Lossos IS, Levy R, Chan WC. (2002) The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*, 99: 2285-2290.
69. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Ott G, Muller-Hermelink HK, Delabie J, Braziel RM, Jaffe ES, Campo E, Lynch JC, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Grogan TM, Staudt LM, Chan WC. (2004) BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 165: 159-166.
70. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, Kim WY, Kim YA, Kim JE, Kim CW. (2008) 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*, 53: 205-217.
71. Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, Del Curto B, Pecciarini L, Uccella S, Pruneri G, Ponzoni M, Mazzucchelli L, Martinelli G, Ferreri AJ, Pinotti G, Assanelli A, Scandurra M, Doglioni C, Zucca E, Capella C, Bertoni F. (2009) BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol*, 40: 645-652.
72. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A. (2005) Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct

- genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*, 106: 3183-3190.
73. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, Carty S, Lam LT, Shaffer AL, Xiao W, Powell J, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Rimsza LM, Fisher RI, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. (2008) Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13520-13525.
  74. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, Pileri SA, Malik F, Macon WR, Goy A, Witzig TE, Czuczman MS. (2011) Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer*, 117: 5058-5066.
  75. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, Shovlin M, Jaffe ES, Janik JE, Staudt LM, Wilson WH. (2009) Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 113: 6069-6076.
  76. Wilson WH, Gerecitano JF, Goy A, de Vos S, Kenkre VP, Barr PM, Blum KA, Shustov AR, Advani RH, Lih J, Williams M, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, Kunkel LA, McGreivy J, Balasubramanian S, Cheng M, Moussa D, Buggy JJ, Staudt LM. (2012) The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. *Blood*, 120: 686-686.
  77. Sujobert P, Salles G, Bachy E. (2016) Molecular Classification of Diffuse Large B-cell Lymphoma: What Is Clinically Relevant? *Hematol Oncol Clin North Am*, 30: 1163-1177.
  78. Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S, Basso K, Lim WK, Klapper W, Schaller C, Reifenberger G, Rubenstein J, Wiestler OD, Spang R, Dalla-Favera R, Siebert R, Deckert M. (2008) Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia*, 22: 400-405.

79. Raoux D, Duband S, Forest F, Trombert B, Chambonniere ML, Dumollard JM, Khaddage A, Gentil-Perret A, Peoc'h M. (2010) Primary central nervous system lymphoma: immunohistochemical profile and prognostic significance. *Neuropathology*, 30: 232-240.
80. Liu J, Wang Y, Liu Y, Liu Z, Cui Q, Ji N, Sun S, Wang B, Wang Y, Sun X, Liu Y. (2017) Immunohistochemical profile and prognostic significance in primary central nervous system lymphoma: Analysis of 89 cases. *Oncol Lett*, 14: 5505-5512.
81. Willis TG, Dyer MJ. (2000) The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood*, 96: 808-822.
82. Montesinos-Rongen M, Zuhlke-Jenisch R, Gesk S, Martin-Subero JI, Schaller C, Van Roost D, Wiestler OD, Deckert M, Siebert R. (2002) Interphase cytogenetic analysis of lymphoma-associated chromosomal breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61: 926-933.
83. Schwindt H, Akasaka T, Zuhlke-Jenisch R, Hans V, Schaller C, Klapper W, Dyer MJ, Siebert R, Deckert M. (2006) Chromosomal translocations fusing the BCL6 gene to different partner loci are recurrent in primary central nervous system lymphoma and may be associated with aberrant somatic hypermutation or defective class switch recombination. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 776-782.
84. Cady FM, O'Neill BP, Law ME, Decker PA, Kurtz DM, Giannini C, Porter AB, Kurtin PJ, Johnston PB, Dogan A, Remstein ED. (2008) Del(6)(q22) and BCL6 rearrangements in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course. *J Clin Oncol*, 26: 4814-4819.
85. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. (2002) Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 117: 322-332.
86. Bernicot I, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, Morel F, De Braekeleer M. (2005) Characterization of IGH rearrangements in non-Hodgkin's B-cell lymphomas by fluorescence in situ hybridization. *Anticancer Res*, 25: 3179-3182.

87. Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M. (2004) Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood*, 103: 1869-1875.
88. Baudis M. (2007) Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer*, 7: 226.
89. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Tabernero J, Baselga J, Tsao MS, DeMichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M. (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463: 899-905.
90. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, Suh YL, Kim SH, Kim JY, Kim SJ, Kim WS, Seto M, Ko YH. (2011) Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117: 1291-1300.
91. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, McPhail E, Asmann YW, Egan J, da Silva JA, Schiff D, Lopes MB, Decker PA, Valdez R, Tibes R, Eckloff B, Witzig TE, Stewart AK, Fonseca R, O'Neill BP. (2015) Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Clin Cancer Res*, 21: 3986-3994.
92. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, Habbita N, Rossetto M, Laurence A, Bruno A, Jouvett A, Polivka M, Adam C, Figarella-Branger D, Miquel C, Vital A, Ghesquieres H, Gressin R, Delwail V, Taillandier L, Chinot O, Soubeyran P, Gyan E, Choquet S, Houillier C, Soussain C, Tanguy ML, Marie Y, Mokhtari K, Hoang-Xuan K. (2012) Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res*, 18: 5203-5211.
93. Booman M, Szuhai K, Rosenwald A, Hartmann E, Kluin-Nelemans H, de Jong

- D, Schuurin E, Kluin P. (2008) Genomic alterations and gene expression in primary diffuse large B-cell lymphomas of immune-privileged sites: the importance of apoptosis and immunomodulatory pathways. *J Pathol*, 216: 209-217.
94. Mardis ER. (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, 24: 133-141.
95. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490: 61-70.
96. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487: 330-337.
97. Xu Z, Huo X, Ye H, Tang C, Nandakumar V, Lou F, Zhang D, Dong H, Sun H, Jiang S, Zhang G, Liu Z, Dong Z, Guo B, He Y, Yan C, Wang L, Su Z, Li Y, Gu D, Zhang X, Wu X, Wei X, Hong L, Zhang Y, Yang J, Gong Y, Tang C, Jones L, Huang XF, Chen SY, Chen J. (2014) Genetic mutation analysis of human gastric adenocarcinomas using ion torrent sequencing platform. *PLoS One*, 9: e100442.
98. (2012) Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489: 519-525.
99. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J, Manyam G, Zoppoli P, Ling S, Rao AA, Grifford M, Cherniack AD, Zhang H, Poisson L, Carlotti CG, Jr., Tirapelli DP, Rao A, Mikkelsen T, Lau CC, Yung WK, Rabadan R, Huse J, Brat DJ, Lehman NL, Barnholtz-Sloan JS, Zheng S, Hess K, Rao G, Meyerson M, Beroukhi R, Cooper L, Akbani R, Wrensch M, Haussler D, Aldape KD, Laird PW, Gutmann DH, Noushmehr H, Iavarone A, Verhaak RG. (2016) Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*, 164: 550-563.
100. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, Haghshenas V, Routbort MJ, Harmon MA, Barkoh BA, Kanagal-Shamanna R, Ravandi F, Cortes JE, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Singh RR. (2014) Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica*, 99: 465-473.
101. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD,

- Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klco JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 150: 264-278.
102. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, Marie Y, Polivka M, Jouvett A, Adam C, Figarella-Branger D, Miquel C, Eimer S, Houillier C, Soussain C, Mokhtari K, Daveau R, Hoang-Xuan K. (2014) Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*, 5: 5065-5075.
103. Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M, Haake A, Purschke F, Sprute R, Mettenmeyer N, Nazzal I, Nagel I, Gutwein J, Richter J, Buchhalter I, Russell RB, Wiestler OD, Eils R, Deckert M, Siebert R. (2015) The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. *Leukemia*, 29: 677-685.
104. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, Matsushita Y, Tamura K, Kinoshita M, Tanaka K, Fukushima S, Takami H, Arita H, Kubo A, Shuto T, Ohno M, Miyakita Y, Kocialkowski S, Sasayama T, Hashimoto N, Maehara T, Shibui S, Ushijima T, Kawahara N, Narita Y, Ichimura K. (2016) Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 42: 279-290.
105. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, Gesk S, Richter J, Hong K, Wiestler OD, Siebert R, Kuppers R, Deckert M. (2010) Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol*, 120: 529-535.
106. Todorovic Balint M, Jelcic J, Mihaljevic B, Kostic J, Stanic B, Balint B, Pejanovic N, Lucic B, Tosic N, Marjanovic I, Stojiljkovic M, Karan-Djurasevic T, Perisic O, Rakocevic G, Popovic M, Raicevic S, Bila J, Antic D, Andjelic B, Pavlovic S. (2016) Gene Mutation Profiles in Primary Diffuse Large B Cell

- Lymphoma of Central Nervous System: Next Generation Sequencing Analyses. *Int J Mol Sci*, 17.
107. Fukumura K, Kawazu M, Kojima S, Ueno T, Sai E, Soda M, Ueda H, Yasuda T, Yamaguchi H, Lee J, Shishido-Hara Y, Sasaki A, Shirahata M, Mishima K, Ichimura K, Mukasa A, Narita Y, Saito N, Aburatani H, Nishikawa R, Nagane M, Mano H. (2016) Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol*, 131: 865-875.
  108. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. (2004) mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 24: 6710-6718.
  109. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123: 569-580.
  110. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6: 1122-1128.
  111. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14: 1296-1302.
  112. Populo H, Lopes JM, Soares P. (2012) The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13: 1886-1918.
  113. Vivanco I, Sawyers CL. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2: 489-501.
  114. Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, Bittner ML, Torhorst J, Haas P, Bucher C, Sauter G, Kallioniemi OP, Kallioniemi A. (2000) Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1252-1259.
  115. Sebestyen A, Sticz TB, Mark A, Hajdu M, Timar B, Nemes K, Nagy N, Varadi Z, Kopper L. (2012) Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 25: 1623-1628.

116. Vajpayee N, Burack R, Wang D, Hutchison RE, Gajra A. (2015) Immunohistochemical expression of mTOR in germinal center and nongerminal center group of diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathological study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 15: 159-163.
117. Xu ZZ, Xia ZG, Wang AH, Wang WF, Liu ZY, Chen LY, Li JM. (2013) Activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in diffuse large B cell lymphoma: clinical significance and inhibitory effect of rituximab. *Ann Hematol*, 92: 1351-1358.
118. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*, 282: 14056-14064.
119. Schlafli P, Troger J, Eckhardt K, Borter E, Spielmann P, Wenger RH. (2011) Substrate preference and phosphatidylinositol monophosphate inhibition of the catalytic domain of the Per-Arnt-Sim domain kinase PASKIN. *Febs j*, 278: 1757-1768.
120. Sonoda Y, Tooyama I, Mukai H, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. (2016) S6 kinase phosphorylated at T229 is involved in tau and actin pathologies in Alzheimer's disease. *Neuropathology*, 36: 325-332.
121. Ferrari S, Bandi HR, Hofsteenge J, Bussian BM, Thomas G. (1991) Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 266: 22770-22775.
122. Xie J, Wang X, Proud CG. (2016) mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*, 5.
123. Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A, Farrell AT, Justice R, Mitchell SS, Sridhara R, Pazdur R. (2010) FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist*, 15: 428-435.
124. Thoreen CC, Sabatini DM. (2009) Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy*, 5: 725-726.
125. Zheng Y, Jiang Y. (2015) mTOR Inhibitors at a Glance. *Mol Cell Pharmacol*, 7: 15-20.
126. Knight SD, Adams ND, Burgess JL, Chaudhari AM, Darcy MG, Donatelli CA,



- Luengo JI, Newlander KA, Parrish CA, Ridgers LH, Sarpong MA, Schmidt SJ, Van Aller GS, Carson JD, Diamond MA, Elkins PA, Gardiner CM, Garver E, Gilbert SA, Gontarek RR, Jackson JR, Kershner KL, Luo L, Raha K, Sherk CS, Sung CM, Sutton D, Tummino PJ, Wegrzyn RJ, Auger KR, Dhanak D. (2010) Discovery of GSK2126458, a Highly Potent Inhibitor of PI3K and the Mammalian Target of Rapamycin. *ACS Med Chem Lett*, 1: 39-43.
127. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chene P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, Garcia-Echeverria C. (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 7: 1851-1863.
128. Yu P, Laird AD, Du X, Wu J, Won KA, Yamaguchi K, Hsu PP, Qian F, Jaeger CT, Zhang W, Buhr CA, Shen P, Abulafia W, Chen J, Young J, Plonowski A, Yakes FM, Chu F, Lee M, Bentzien F, Lam ST, Dale S, Matthews DJ, Lamb P, Foster P. (2014) Characterization of the activity of the PI3K/mTOR inhibitor XL765 (SAR245409) in tumor models with diverse genetic alterations affecting the PI3K pathway. *Mol Cancer Ther*, 13: 1078-1091.
129. Nitta N, Nakasu S, Shima A, Nozaki K. (2016) mTORC1 signaling in primary central nervous system lymphoma. *Surg Neurol Int*, 7: S475-480.
130. Fortina P, Surrey S. (2008) Digital mRNA profiling. *Nat Biotechnol*, 26: 293-294.
131. Araf S, Korfi K, Rahim T, Davies A, Fitzgibbon J. (2016) Advances in the molecular diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma in the era of precision medicine. *Expert Rev Mol Diagn*, 16: 1093-1102.
132. Karmali R, Gordon LI. (2017) Molecular Subtyping in Diffuse Large B Cell Lymphoma: Closer to an Approach of Precision Therapy. *Curr Treat Options Oncol*, 18: 11.
133. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Escoda L, Martinez S, Valera A, Martinez A, Jares P, Pinyol M, Garcia-Herrera A, Martinez-Trillos A, Gine E, Villamor N, Campo E, Colomo L, Lopez-Guillermo A. (2011) Gene-

- expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*, 117: 4836-4843.
134. Larocca LM, Capello D, Rinelli A, Nori S, Antinori A, Gloghini A, Cingolani A, Migliazza A, Saglio G, Cammilleri-Broet S, Raphael M, Carbone A, Gaidano G. (1998) The molecular and phenotypic profile of primary central nervous system lymphoma identifies distinct categories of the disease and is consistent with histogenetic derivation from germinal center-related B cells. *Blood*, 92: 1011-1019.
  135. Sugita Y, Tokunaga O, Nakashima A, Shigemori M. (2004) SHP-1 expression in primary central nervous system B-cell lymphomas in immunocompetent patients reflects maturation stage of normal B cell counterparts. *Pathol Int*, 54: 659-666.
  136. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, Dunford AJ, Meredith DM, Thorner AR, Jordanova ES, Liu G, Feuerhake F, Ducar MD, Illerhaus G, Gusenleitner D, Linden EA, Sun HH, Homer H, Aono M, Pinkus GS, Ligon AH, Ligon KL, Ferry JA, Freeman GJ, van Hummelen P, Golub TR, Getz G, Rodig SJ, de Jong D, Monti S, Shipp MA. (2016) Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood*, 127: 869-881.
  137. Zhou Y, Liu W, Xu Z, Zhu H, Xiao D, Su W, Zeng R, Feng Y, Duan Y, Zhou J, Zhong M. (2018) Analysis of Genomic Alteration in Primary Central Nervous System Lymphoma and the Expression of Some Related Genes. *Neoplasia*, 20: 1059-1069.
  138. Courts C, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bug S, Siemer D, Hans V, Blumcke I, Klapper W, Schaller C, Wiestler OD, Kuppers R, Siebert R, Deckert M. (2008) Recurrent inactivation of the PRDM1 gene in primary central nervous system lymphoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67: 720-727.
  139. Zheng M, Perry AM, Bierman P, Loberiza F, Jr., Nasr MR, Szwajcer D, Del Bigio MR, Smith LM, Zhang W, Greiner TC. (2017) Frequency of MYD88 and CD79B mutations, and MGMT methylation in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Neuropathology*, 37: 509-516.
  140. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H,

- Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. (2011) Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470: 115-119.
141. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, Roulland S, Kasbekar M, Young RM, Shaffer AL, Hodson DJ, Xiao W, Yu X, Yang Y, Zhao H, Xu W, Liu X, Zhou B, Du W, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Lopez-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Tay Kuang Wei K, Zelenetz AD, Leonard JP, Bartlett NL, Tran B, Shetty J, Zhao Y, Soppet DR, Pittaluga S, Wilson WH, Staudt LM. (2018) Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 378: 1396-1407.
142. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, Lih CJ, Williams PM, Shaffer AL, Gerecitano J, de Vos S, Goy A, Kenkre VP, Barr PM, Blum KA, Shustov A, Advani R, Fowler NH, Vose JM, Elstrom RL, Habermann TM, Barrientos JC, McGreivy J, Fardis M, Chang BY, Clow F, Munneke B, Moussa D, Beaupre DM, Staudt LM. (2015) Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*, 21: 922-926.
143. Mondello P, Cuzzocrea S, Mian M. (2014) Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going? *J Hematol Oncol*, 7: 95.
144. Brault L, Menter T, Obermann EC, Knapp S, Thommen S, Schwaller J, Tzankov A. (2012) PIM kinases are progression markers and emerging therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer*, 107: 491-500.
145. Kuo HP, Ezell SA, Hsieh S, Schweighofer KJ, Cheung LW, Wu S, Apatira M, Sirisawad M, Eckert K, Liang Y, Hsu J, Chen CT, Beaupre D, Chang BY. (2016) The role of PIM1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Cancer Res*, 6: 2489-2501.
146. Ahuja N, Sharma AR, Baylin SB. (2016) Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annu Rev Med*, 67: 73-89.
147. Ren B, Chee KJ, Kim TH, Maniatis T. (1999) PRDI-BF1/Blimp-1 repression is

- mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev*, 13: 125-137.
148. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, Aster JC, Murty VV, Shipp MA, Dalla-Favera R. (2006) Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*, 203: 311-317.
  149. Dubois S, Viailly PJ, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Marchand V, Maingonnat C, Mareschal S, Picquenot JM, Penther D, Jais JP, Tesson B, Peyrouze P, Figeac M, Desmots F, Fest T, Haioun C, Lamy T, Copie-Bergman C, Fabiani B, Delarue R, Peyrade F, Andre M, Ketterer N, Leroy K, Salles G, Molina TJ, Tilly H, Jardin F. (2017) Biological and Clinical Relevance of Associated Genomic Alterations in MYD88 L265P and non-L265P-Mutated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Analysis of 361 Cases. *Clin Cancer Res*, 23: 2232-2244.
  150. Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, Schilder-Tol EJ, Oud ME, Scheepstra C, Kluin PM, Kersten MJ, Spaargaren M, Pals ST. (2013) High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J*, 3: e139.
  151. Takano S, Hattori K, Ishikawa E, Narita Y, Iwadate Y, Yamaguchi F, Nagane M, Akimoto J, Oka H, Tanaka S, Sakata M, Matsuda M, Yamamoto T, Chiba S, Matsumura A. (2018) MyD88 Mutation in Elderly Predicts Poor Prognosis in Primary Central Nervous System Lymphoma: Multi-Institutional Analysis. *World Neurosurg*, 112: e69-e73.
  152. Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM. (2014) Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4.
  153. Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Liu X, Powell J, Wright GW, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM. (2011) Recurrent Oncogenic Mutations in CCND3 in Aggressive Lymphomas. *Blood*, 118: 435-435.
  154. Smith CC, Viny AD, Massi ES, Kandoth C, Socci ND, Hsu H, West B, Bollag G, Taylor BS, Levine RL, Shah NP. (2015) Recurrent Mutations in CCND3 Confer Clinical Resistance to FLT3 Inhibitors. *Blood*, 126: 677-677.
  155. Armijo ME, Campos T, Fuentes-Villalobos F, Palma ME, Pincheira R, Castro AF.

- (2016) Rheb signaling and tumorigenesis: mTORC1 and new horizons. *Int J Cancer*, 138: 1815-1823.
156. Neuman NA , Henske EP. (2011) Non-canonical functions of the tuberous sclerosis complex-Rheb signalling axis. *EMBO Mol Med*, 3: 189-200.
157. Qin X, Jiang B, Zhang Y. (2016) 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, 15: 781-786.
158. Schick V, Majores M, Engels G, Hartmann W, Elger CE, Schramm J, Schoch S, Becker AJ. (2007) Differential Pi3K-pathway activation in cortical tubers and focal cortical dysplasias with balloon cells. *Brain Pathol*, 17: 165-173.
159. Mark A. (2014) [Significance of mTOR (mammalian target of rapamycin) activity in human lymphomas]. *Magy Onkol*, 58: 143-148.
160. Grose JH , Rutter J. (2010) The role of PAS kinase in PASSing the glucose signal. *Sensors (Basel)*, 10: 5668-5682.
161. Rutter J, Michnoff CH, Harper SM, Gardner KH, McKnight SL. (2001) PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8991-8996.
162. Hao HX, Cardon CM, Swiatek W, Cooksey RC, Smith TL, Wilde J, Boudina S, Abel ED, McClain DA, Rutter J. (2007) PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 15466-15471.
163. Semplici F, Mondragon A, Macintyre B, Madeyski-Bengston K, Persson-Kry A, Barr S, Ramne A, Marley A, McGinty J, French P, Soedling H, Yokosuka R, Gaitan J, Lang J, Migrenne-Li S, Philippe E, Herrera PL, Magnan C, da Silva Xavier G, Rutter GA. (2016) Cell type-specific deletion in mice reveals roles for PAS kinase in insulin and glucagon production. *Diabetologia*, 59: 1938-1947.
164. Katschinski DM, Marti HH, Wagner KF, Shibata J, Eckhardt K, Martin F, Depping R, Paasch U, Gassmann M, Ledermann B, Desbaillets I, Wenger RH. (2003) Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN. *Mol Cell Biol*, 23: 6780-6789.
165. Zhang DD, Zhang JG, Wang YZ, Liu Y, Liu GL, Li XY. (2015) Per-Arnt-Sim Kinase (PASK): An Emerging Regulator of Mammalian Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients*, 7: 7437-7450.
166. Eckhardt K, Troger J, Reissmann J, Katschinski DM, Wagner KF, Stengel P,

Paasch U, Hunziker P, Borter E, Barth S, Schlafli P, Spielmann P, Stiehl DP, Camenisch G, Wenger RH. (2007) Male germ cell expression of the PAS domain kinase PASKIN and its novel target eukaryotic translation elongation factor eEF1A1. *Cell Physiol Biochem*, 20: 227-240.

## X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

*Az értekezés témájában megjelent közlemények:*

1. **Marosvári D**; Nagy N; Kriston Cs; Deák B; Hajdu M; Bödör Cs; Csala I; Bagó AG; Szállási Z; Sebestyén A; Reininger L. Discrepancy Between Low Levels of mTOR Activity and High Levels of P-S6 in Primary Central Nervous System Lymphoma May Be Explained by PAS Domain-Containing Serine/Threonine-Protein Kinase-Mediated Phosphorylation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 77: 268-273. (2018). **IF: 3,460**
2. Bödör Cs; Alpár D; **Marosvári D**; Galik B; Rajnai H; Bártai B; Nagy Á; Kajtár B; Burján A; Deák B; Schneider T; Alizadeh H; Matolcsy A; Sebastian B; Storhoff J; Chen N; Liu MD; Ghali N; Csala I; Bagó AG; Gyenesei A; Reininger L. Molecular subtypes and genomic profile of primary central nervous system lymphoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. (2019). *doi: 10.1093/jnen/nlz125*. **IF: 3,460\***

*Egyéb témában megjelent közlemények:*

1. Gángó AP; Alpár D; Galik B; **Marosvári D**; Kiss R; Fésüs V; Aczél D; Eyüpoglu E; Nagy N; Nagy Á; Krizsán Sz; Reininger L, Farkas P; Kozma A; Ádám E; Tasnády Sz; Réti M; Matolcsy A; Gyenesei A; Mátrai Z; Bödör Cs. Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *International Journal of Cancer*. 146: 85-93. (2019). **IF: 4,982**
2. Szurián K; Csala I; **Marosvári D**; Rajnai H; Dezső K; Bödör Cs; Piurkó V; Matolcsy A; Reininger L. EZH2 is upregulated in the proliferation centers of CLL/SLL lymph nodes. *Experimental and Molecular Pathology*. 105: 161-165. (2018). **IF: 2,350**

3. Fesüs V; **Marosvári D**; Kajtár B; Király PA; Demeter J; Gurbity Pálfi T; Egyed M; Plander M; Farkas P; Mátrai Z; Matolcsy A; Bődör Cs. A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában [TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia]. Orvosi Hetilap. 158: 220-228. (2017). **IF: 0,322**
4. Kiss R; Király PA; Gaál-Weisinger J; **Marosvári D**; Gángó AP; Demeter J; Bődör Cs. A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. [Molecular monitoring of myeloid leukemia]. Magyar Onkológia. 61: 57-66. (2017)
5. Király AP; Alpár D; Fesüs V; **Marosvári D**; Matolcsy A; Bődör Cs. Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgalómódszereinek alapjai. [Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology]. Magyar Onkológia. 60: 88-98. (2016).
6. Király PA; Kállay K; **Marosvári D**; Benyó G; Szőke A; Csomor J; Bődör Cs. Familiáris myelodysplasiás szindróma és akut myeloid leukaemia klinikai és genetikai háttere [Clinical and genetic background of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia]. Orvosi Hetilap. 157: 283-289. (2016). **IF: 0,349**
7. **Marosvári D**; Alpár D; Király PA; Rajnai H; Reiniger L; Bődör Cs. A krónikus limfocitás leukémia genetikai háttere az újgenerációs szekvenálás korszakában [The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia]. Magyar Onkológia. 60: 118-125. (2016).
8. Rajnics P; Kellner Á; Karádi É; Moizs M; Bődör Cs; Király PA; **Marosvári D**; Andrikovics H; Egyed M. Increased Lipocalin 2 level may have important role in thrombotic events in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. Leukemia Research. 48: 101-106. (2016). **IF: 2,501**



9. **Marosvári D**; Téglási V; Csala I; Marschalkó M; Bődör Cs; Timár B; Csomor J; Hársing J; Reiniger L. Altered MicroRNA Expression in Folliculotropic and Transformed Mycosis Fungoides. *Pathology and Oncology Research*. 21: 821-825. (2015) . **IF: 1,940**

## XI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönettel tartozom szüleimnek, hogy lehetővé tették tanulmányaimat, férjemnek és családomnak, hogy mindig támogattak eddigi pályám során.

Köszönöm Dr. Matolcsy András Professzor Úrnak, hogy az Intézetében végezhettem PhD tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Reiniger Lillának és Dr. Bödör Csabának a rengeteg szakmai és baráti segítségét, amit tőlük az évek során kaptam. Köszönöm, hogy bármikor fordulhattam Hozzájuk kérdéseimmel.

Köszönöm Dr. Sebestyén Annának, hogy a laborjában dolgozhattam, és a szakmai támogatását.

Szeretném megköszönni Dr. Király Péternek és Dr. Nagy Noéminek a labormunkában nyújtott segítséget, és az együtt töltött időt.

Köszönöm a hematopatológiai labor minden munkatársának, hogy az Intézetben eltöltött idő alatt mind szakmai, mind baráti támogatást nyújtottak.

Köszönöm Dr. Barna Gábornak és Dr. Kriston Csillának az áramlás cytometriai vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Timár Botondnak, aki házi bírálóként a dolgozat színvonalát jelentősen emelte.

Végül szeretnék köszönetet mondani az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi munkatársának.

## XII. FÜGGELÉK

## 1. Függelék. A nagy érzékenységű, új-generecációs újraszekvenálással azonosított mutációk

Eset szám	Gén	Azonosított eltérés	cDNS pozíció	Protein pozíció	VAF	COSMIC azonosító
P45	<i>CARD11</i>	missense_variant	c.739A>G	p.Arg247Gly	37,1%	.
P46	<i>CARD11</i>	missense_variant	c.746A>C	p.Gln249Pro	14,3%	COSM133703
P11	<i>CARD11</i>	missense_variant	c.779G>C	p.Arg260Pro	60,5%	.
P10	<i>CARD11</i>	disruptive_inframe_deletion	c.699_701delGCA	p.Lys233_His233	46,0%	COSM85976
P43	<i>CARD11</i>	conservative_inframe_deletion	c.688_699delGATCAGCTAAAG	p.Asp230_Lys233	3,0%	.
P28	<i>CCND3</i>	3_prime_UTR_variant	c.*173G>T		62,9%	.
P51	<i>CCND3</i>	3_prime_UTR_variant	c.*546G>A		3,6%	.
P51	<i>CCND3</i>	missense_variant	c.851C>T	p.Pro284Leu	33,2%	COSM220537
P10	<i>CCND3</i>	3_prime_UTR_variant	c.*902G>C		61,8%	.
P45	<i>CCND3</i>	conservative_inframe_deletion	c.868_873delIATACAC	p.Ile290_His290	30,4%	.
P29	<i>CCND3</i>	3_prime_UTR_variant	c.*320_*322delCCC		2,5%	.
P15	<i>CCND3</i>	3_prime_UTR_variant	c.*319_*320insT		2,8%	.
S3	<i>CCND3</i>	3_prime_UTR_variant	c.*321_*322delCC		1,8%	.
P7	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.587A>G	p.Tyr196Cys	70,1%	COSM220736
S1	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.586T>C	p.Tyr196His	47,3%	COSM220734
P2	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.587A>T	p.Tyr196Phe	24,4%	COSM220735
P44	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.489G>A	p.Met163Ile	94,4%	.
P4	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.587A>C	p.Tyr196Ser	45,5%	COSM220733
P43	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.587A>G	p.Tyr196Cys	96,2%	COSM220736
P43	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.563C>G	p.Ala188Gly	96,2%	.
P5	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.586T>A	p.Tyr196Asn	84,5%	COSM144393
P9	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.270G>T	p.Lys90Asn	21,0%	.
P3	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.586T>C	p.Tyr196His	52,8%	COSM220734
P8	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.586T>C	p.Tyr196His	65,6%	COSM220734
P1	<i>CD79B</i>	missense_variant	c.586T>G	p.Tyr196Asp	37,3%	COSM1737939
P6	<i>CD79B</i>	disruptive_inframe_deletion	c.486_488delCAT	p.Ile162del	38,0%	.
P45	<i>CSMD2</i>	missense_variant	c.1112G>A	p.Arg371His	56,1%	.
P27	<i>CSMD2</i>	missense_variant	c.1042G>A	p.Val348Ile	56,1%	COSM4444260
P4	<i>CSMD3</i>	missense_variant	c.3683G>A	p.Arg1228Gln	51,6%	.
P58	<i>CSMD3</i>	missense_variant	c.3683G>A	p.Arg1228Gln	29,0%	.

P18	<i>IRF4</i>	5_prime_UTR_variant	c.-48C>T		92,7%	.
P16	<i>IRF4</i>	5_prime_UTR_variant	c.-2G>A		39,2%	.
P2	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.152G>A	p.Arg51His	73,4%	.
P15	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.70C>A	p.Leu24Ile	33,5%	COSM4171587
P44	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.108G>C	p.Lys36Asn	36,5%	COSM6206705
P44	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.208C>G	p.Leu70Val	53,0%	COSM4610567
P13	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.208C>G	p.Leu70Val	83,3%	COSM4610567
P17	<i>IRF4</i>	5_prime_UTR_variant	c.-18G>A		52,4%	.
P17	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.208C>G	p.Leu70Val	42,2%	COSM4610567
P19	<i>IRF4</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.216+5C>T		65,2%	.
S6	<i>IRF4</i>	5_prime_UTR_variant	c.-51G>C		28,1%	.
P12	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.59G>T	p.Gly20Val	39,5%	.
P10	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.118C>G	p.Leu40Val	56,0%	COSM220627
P1	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.7C>A	p.Leu3Met	64,7%	.
P1	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.143G>A	p.Ser48Asn	22,4%	.
P1	<i>IRF4</i>	missense_variant	c.208C>T	p.Leu70Phe	12,2%	COSM6209962
P14	<i>IRF4</i>	frameshift_variant	c.38_39delG	p.Gly13fs	25,3%	.
P16	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12028T>C	p.Ser4010Pro	49,3%	COSM5020054
P2	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12028T>C	p.Ser4010Pro	52,7%	COSM5020054
P2	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.9983C>T	p.Pro3328Leu	3,5%	.
P15	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.10192A>G	p.Met3398Val	50,9%	COSM5019243
P34	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.9655G>A	p.Ala3219Thr	7,0%	.
P13	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12158C>T	p.Thr4053Ile	6,5%	COSM4461655
P30	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.15544G>A	p.Gly5182Ser	6,0%	.
P59	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.1529C>T	p.Ser510Leu	17,9%	COSM4468161
P17	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.10192A>G	p.Met3398Val	29,2%	COSM5019243
P48	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12028T>C	p.Ser4010Pro	49,2%	COSM5020054
P43	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.10007C>T	p.Ala3336Val	64,2%	.
P55	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.1426G>A	p.Ala476Thr	52,7%	COSM6494206
P6	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12152T>A	p.Ile4051Lys	45,6%	.
P6	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.10208C>T	p.Ala3403Val	6,3%	.

S6	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12028T>C	p.Ser4010Pro	45,7%	COSM5020054
S10	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.12028T>C	p.Ser4010Pro	64,2%	COSM5020054
P53	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.8774C>T	p.Ala2925Val	43,0%	COSM1717661
P31	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.4388C>T	p.Thr1463Ile	4,2%	.
P31	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.4316C>T	p.Pro1439Leu	6,1%	.
P8	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.10024C>T	p.Arg3342Cys	38,1%	.
P38	<i>KMT2D</i>	missense_variant	c.15641G>A	p.Arg5214His	53,1%	COSM2006617
P14	<i>KMT2D</i>	frameshift_variant	c.15173delT	p.Val5058fs	42,1%	.
P22	<i>KMT2D</i>	disruptive_inframe_deletion	c.11211_11222delGCAGCAGCAGCA	p.Gln3738_Gln	10,6%	.
P58	<i>KMT2D</i>	disruptive_inframe_deletion	c.11211_11222delGCAGCAGCAGCA	p.Gln3738_Gln	5,0%	.
P23	<i>KMT2D</i>	disruptive_inframe_deletion	c.11211_11222delGCAGCAGCAGCA	p.Gln3738_Gln	48,6%	.
P47	<i>MYC</i>	missense_variant	c.438G>C	p.Gln146His	78,9%	.
P48	<i>MYC</i>	stop_lost	c.1365A>C	p.Ter455Tyrext	69,3%	.
P49	<i>MYC</i>	missense_variant	c.217A>G	p.Thr73Ala	81,0%	COSM1163490
S6	<i>MYC</i>	missense_variant	c.558C>G	p.Cys186Trp	63,7%	.
P23	<i>MYC</i>	missense_variant	c.558C>G	p.Cys186Trp	18,4%	.
P22	<i>MYC</i>	missense_variant	c.558C>G	p.Cys186Trp	17,2%	.
P12	<i>MYC</i>	missense_variant	c.64T>C	p.Phe22Leu	53,5%	COSM3358206
P25	<i>MYC</i>	missense_variant	c.558C>G	p.Cys186Trp	5,7%	.
P20	<i>MYC</i>	missense_variant	c.467C>A	p.Ala156Asp	5,4%	.
P11	<i>MYC</i>	missense_variant	c.214C>T	p.Pro72Ser	48,4%	COSM3316879
P11	<i>MYC</i>	missense_variant	c.215C>T	p.Pro72Leu	48,3%	COSM6210943
P21	<i>MYC</i>	missense_variant	c.64T>C	p.Phe22Leu	26,9%	COSM3358206
P24	<i>MYC</i>	missense_variant	c.162G>C	p.Glu54Asp	49,7%	COSM1159796
P24	<i>MYC</i>	missense_variant	c.788C>T	p.Thr263Ile	31,6%	.
P13	<i>MYC</i>	3_prime_UTR_variant	c.*198_*199delTT		12,9%	.
P28	<i>MYD88</i>	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	41,4%	COSM85940
P7	<i>MYD88</i>	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	21,3%	COSM85940
S1	<i>MYD88</i>	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	46,4%	COSM85940
P40	<i>MYD88</i>	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	91,6%	COSM85940
P37	<i>MYD88</i>	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	18,0%	COSM85940
P41	<i>MYD88</i>	missense_variant	c.728G>A	p.Ser243Asn	58,9%	COSM85943

P14	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	87,4%	COSM85940
P18	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	77,9%	COSM85940
P16	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	21,1%	COSM85940
P2	MYD88	missense_variant& splice_region_variant	c.773C>T	p.Pro258Leu	33,0%	.
P15	MYD88	3_prime_UTR_variant	c.*89C>T		5,4%	.
P34	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	42,7%	COSM85940
P34	MYD88	3_prime_UTR_variant	c.*991C>T		7,0%	.
S3	MYD88	missense_variant	c.695T>C	p.Met232Thr	46,5%	COSM85942
P39	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	59,1%	COSM85940
P13	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	24,1%	COSM85940
P30	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	36,4%	COSM85940
P32	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	39,0%	COSM85940
P29	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	45,9%	COSM85940
P35	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	56,4%	COSM85940
P4	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	74,7%	COSM85940
P17	MYD88	missense_variant	c.656C>G	p.Ser219Cys	49,3%	COSM85944
P17	MYD88	missense_variant	c.658A>G	p.Ile220Val	49,3%	.
P33	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	28,4%	COSM85940
P6	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	22,2%	COSM85940
P19	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	46,2%	COSM85940
P5	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	35,5%	COSM85940
S4	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	69,1%	COSM85940
P23	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	59,4%	COSM85940
P22	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	28,1%	COSM85940
P12	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	31,3%	COSM85940
P12	MYD88	missense_variant	c.878G>A	p.Cys293Tyr	31,7%	.
P42	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	17,9%	COSM85940
P9	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	60,9%	COSM85940
P25	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	5,2%	COSM85940

P20	MYD88	missense_variant	c.649G>T	p.Val1217Phe	46,3%	COSM85941
P27	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	68,5%	COSM85940
P31	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	47,7%	COSM85940
P11	MYD88	missense_variant	c.656C>G	p.Ser219Cys	32,0%	COSM85944
P26	MYD88	missense_variant	c.656C>G	p.Ser219Cys	38,1%	COSM85944
P36	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	26,5%	COSM85940
P10	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	38,8%	COSM85940
P3	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	39,8%	COSM85940
P8	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	41,4%	COSM85940
P21	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	54,9%	COSM85940
P24	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	60,2%	COSM85940
P38	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	45,9%	COSM85940
P1	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	27,1%	COSM85940
S5	MYD88	missense_variant	c.794T>C	p.Leu265Pro	77,5%	COSM85940
S2	MYD88	missense_variant	c.476G>A	p.Gly159Asp	5,5%	.
P7	PAX5	5_prime_UTR_variant	c.-23C>T		72,7%	.
P35	PAX5	missense_variant	c.26C>T	p.Thr91Ile	76,8%	.
S8	PAX5	missense_variant	c.23C>G	p.Pro8Arg	42,8%	.
P45	PIM1	missense_variant	c.296G>A	p.Gly99Asp	36,2%	COSM4610153
S1	PIM1	missense_variant	c.111G>C	p.Gln37His	85,0%	COSM220744
S1	PIM1	missense_variant	c.290G>A	p.Ser97Asn	68,8%	COSM220740
P14	PIM1	missense_variant	c.93G>C	p.Lys31Asn	46,0%	.
P18	PIM1	missense_variant	c.94G>A	p.Glu32Lys	60,0%	.
P16	PIM1	missense_variant	c.97C>T	p.Pro33Ser	26,8%	COSM3076476
P16	PIM1	missense_variant	c.224C>T	p.Ser75Phe	23,8%	COSM742153
P16	PIM1	missense_variant	c.233G>A	p.Gly78Glu	22,1%	COSM6210491
P16	PIM1	splice_region_variant&intron_variant	c.240+8C>T		22,4%	
P16	PIM1	missense_variant	c.373C>G	p.Pro125Ala	23,4%	COSM4610416
P16	PIM1	missense_variant	c.437G>A	p.Ser146Asn	22,0%	.
S7	PIM1	missense_variant	c.134G>A	p.Gly45Asp	4,7%	.

P54	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.83-5C>T		27,1%	.
P12	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	36,3%	COSM1161628
P53	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.316C>T	p.Leu106Phe	22,0%	.
P20	<i>PIM1</i>	missense_variant&splice_region_variant	c.83G>A	p.Gly28Asp	37,3%	COSM1581462
P31	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.241C>T	p.Pro81Ser	78,2%	COSM5655253
P10	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.241-3C>T		36,3%	.
P10	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.544C>T	p.Leu182Phe	75,0%	.
P3	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	38,3%	COSM1161628
P21	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	51,8%	COSM1161628
P1	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.238C>T	p.Leu80Leu	39,9%	COSM5650891
P1	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	32,4%	COSM1161628
P1	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.427C>G	p.Leu143Val	19,5%	.
P10	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.190-10_190-8delGGG		5,3%	.
P4	<i>PIM1</i>	frameshift_variant	c.454_467delCTGGAGGCCGTGCG	p.Leu152fs	3,5%	.
P7	<i>PRDM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	56,2%	COSM97162
S1	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*1821G>T		34,2%	.
P56	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*732G>A		8,5%	.
P37	<i>PRDM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	9,7%	COSM97162
S9	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.1348C>T	p.Leu450Phe	53,8%	COSM5020484
P57	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.1730G>A	p.Cys577Tyr	76,8%	.
P16	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.1348C>T	p.Leu450Phe	34,5%	COSM5020484
P2	<i>PRDM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	52,2%	COSM97162
P15	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*1352C>T		6,1%	.
S3	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.260T>G	p.Leu87Arg	49,2%	.
P13	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*1360G>A		5,8%	.



P54	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.83-5C>T		27,1%	.
P12	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	36,3%	COSM1161628
P53	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.316C>T	p.Leu106Phe	22,0%	.
P20	<i>PIM1</i>	missense_variant&splice_region_variant	c.83G>A	p.Gly28Asp	37,3%	COSM1581462
P31	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.241C>T	p.Pro81Ser	78,2%	COSM5655253
P10	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.241-3C>T		36,3%	.
P10	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.544C>T	p.Leu182Phe	75,0%	.
P3	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	38,3%	COSM1161628
P21	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	51,8%	COSM1161628
P1	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.238C>T	p.Leu80Leu	39,9%	COSM5650891
P1	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.403G>A	p.Glu135Lys	32,4%	COSM1161628
P1	<i>PIM1</i>	missense_variant	c.427C>G	p.Leu143Val	19,5%	.
P10	<i>PIM1</i>	splice_region_variant&intron_variant	c.190-10_190-8delGGG		5,3%	.
P4	<i>PIM1</i>	frameshift_variant	c.454_467delCTGGAGGCCGTGCG	p.Leu152fs	3,5%	.
P7	<i>PRDM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	56,2%	COSM97162
S1	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*1821G>T		34,2%	.
P56	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*732G>A		8,5%	.
P37	<i>PRDM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	9,7%	COSM97162
S9	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.1348C>T	p.Leu450Phe	53,8%	COSM5020484
P57	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.1730G>A	p.Cys577Tyr	76,8%	.
P16	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.1348C>T	p.Leu450Phe	34,5%	COSM5020484
P2	<i>PRDM1</i>	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	52,2%	COSM97162
P15	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*1352C>T		6,1%	.
S3	<i>PRDM1</i>	missense_variant	c.260T>G	p.Leu87Arg	49,2%	.
P13	<i>PRDM1</i>	3_prime_UTR_variant	c.*1360G>A		5,8%	.

P30	PRDM1	splice_region_variant&intron_variant	c.291+6C>T		32,4%	.
P30	PRDM1	missense_variant	c.1310T>A	p.Phe437Tyr	49,3%	.
P52	PRDM1	missense_variant	c.1348C>T	p.Leu450Phe	93,2%	COSM5020484
P5	PRDM1	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	61,4%	COSM97162
P9	PRDM1	missense_variant	c.250C>G	p.Pro84Ala	31,3%	.
P9	PRDM1	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	31,9%	COSM97162
P9	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*104C>G		33,8%	.
P31	PRDM1	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	79,5%	COSM97162
P26	PRDM1	missense_variant	c.1141T>C	p.Tyr381His	76,2%	.
P36	PRDM1	splice_region_variant&synonymous_variant	c.291G>A	p.Glu97Glu	22,0%	COSM97162
P8	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*1569A>C		43,9%	.
S2	PRDM1	missense_variant&splice_region_variant	c.291G>C	p.Glu97Asp	26,2%	COSM97137
S2	PRDM1	missense_variant	c.2312G>A	p.Gly771Asp	60,2%	COSM5020312
P30	PRDM1	frameshift_variant	c.1309_1310insCGGGA	p.Phe437fs	49,1%	.
P55	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*1203delT		49,7%	.
S7	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*1819_*1820delTT		23,9%	.
S6	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*212_*213delIAT		21,1%	.
P7	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*1819_*1820delITT		15,1%	.
P9	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*212_*213delIAT		20,9%	.
P4	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*212_*213delIAT		20,9%	.
P35	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*1819_*1820delITT		19,6%	.
S3	PRDM1	frameshift_variant	c.814dupT	p.Ser272fs	12,1%	.
P9	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*212_*213delIAT		13,6%	.
S6	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*1820dupT		6,9%	.
P4	PRDM1	3_prime_UTR_variant	c.*212_*213delIAT		12,6%	.

P14	<i>TP53</i>	missense_variant	c.422G>A	p.Cys141Tyr	90,0%	COSM131470
P47	<i>TP53</i>	missense_variant	c.743G>A	p.Arg248Gln	85,0%	COSM10662
P50	<i>TP53</i>	missense_variant	c.761T>G	p.Ile254Ser	68,2%	COSM45035
P27	<i>TP53</i>	missense_variant	c.638G>A	p.Arg213Gln	81,0%	COSM10735
P26	<i>TP53</i>	missense_variant	c.743G>A	p.Arg248Gln	35,9%	COSM10662
P3	<i>TP53</i>	missense_variant	c.742C>T	p.Arg248Trp	50,1%	COSM10656
P1	<i>TP53</i>	missense_variant	c.535C>G	p.His179Asp	76,6%	COSM2744838
S2	<i>TP53</i>	missense_variant	c.734G>A	p.Gly245Asp	4,2%	COSM3388189