

# Mehanizmi razvoja B-staničnih limfoma

---

Vukušić, Kruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:880479>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Mehanizmi razvoja B-staničnih limfoma  
Mechanisms of B-cell lymphoma development

SEMINARSKI RAD

Kruno Vukušić  
Preddiplomski studij biologije  
Mentor: doc.dr. Petra Korać

Zagreb, 2013.

## ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici doc.dr. Petri Korać na ispravicima i savjetima oko organiziranja ovoga seminarskog rada. Zahvaljujem i prof. Željki Bujan na lekturi i korekturi ovoga seminarskog rada.

# SADRŽAJ

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ZAHVALE.....</b>                                                       | <b>2</b>  |
| <b>SADRŽAJ .....</b>                                                      | <b>3</b>  |
| <b>1. UVOD, DEFINICIJE, KLASIFIKACIJA I EPIDEMIOLOGIJA.....</b>           | <b>4</b>  |
| <b>2. DIFERENCIJACIJA B-STANICA I STANIČNO PODRIJETLO B-LIMFOMA .....</b> | <b>8</b>  |
| 2.1. DIFERENCIJACIJA B-STANICA .....                                      | 8         |
| 2.2. PODRIJETLO B-STANIČNIH LIMFOMA .....                                 | 11        |
| <b>3. MEHANIZMI TRANSFORMACIJE B-STANIČNIH LIMFOMA.....</b>               | <b>15</b> |
| <b>4. POJEDINI TIPOVI B-STANIČNIH LIMFOMA .....</b>                       | <b>26</b> |
| 4.1. FOLIKULARNI LIMFOM (FL) .....                                        | 26        |
| 4.2. DIFUZNI B-VELIKOSTANIČNI LIMFOM (DLBCL).....                         | 28        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>                                                 | <b>31</b> |
| <b>6. SAŽETAK .....</b>                                                   | <b>32</b> |
| <b>7. SUMMARY .....</b>                                                   | <b>33</b> |
| <b>8. LITERATURA.....</b>                                                 | <b>34</b> |

## 1. UVOD, DEFINICIJE, KLASIFIKACIJA I EPIDEMIOLOGIJA

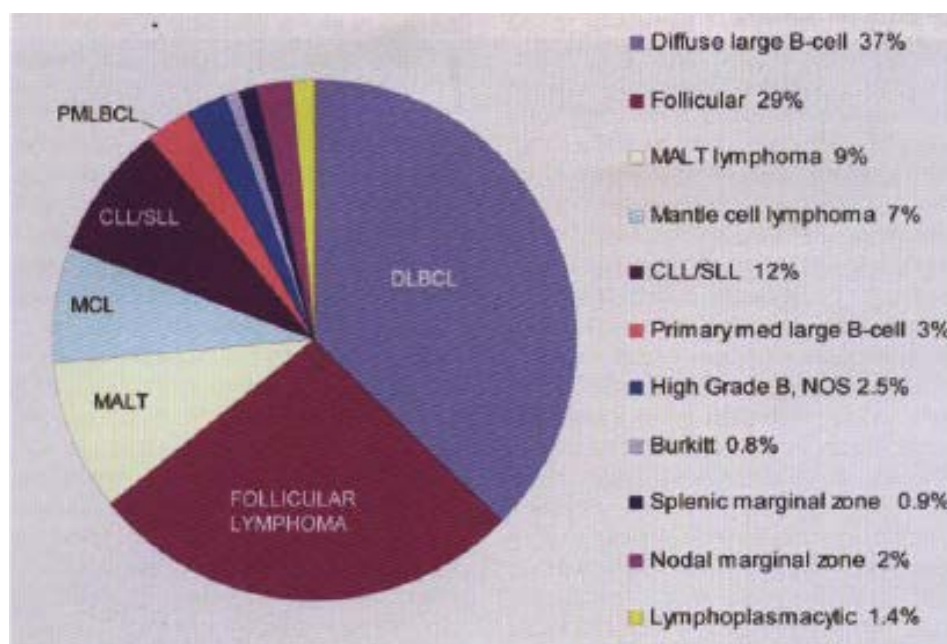
Limfomi su heterogena skupina malignih bolesti B-stanica, T-stanica i rijetko prirodnoubilačkih (NK) stanica koje imaju podrijetlo od jednog limfocita koji je prošao kroz transformaciju koja mu je dala selektivnu prednost u rastu i preživljavanju u odnosu na normalni stanični tip od kojeg je potekao (Williams, 2010.). Neoplazma obično ima podrijetlo u limfnim čvorovima ili limfatičnom tkivu na drugim mjestima u tijelu (tzv. ektranodalni limfomi) i mogu biti lokalizirani ili široko rašireni u vrijeme kada se limfom dijagnosticira. Današnja klasifikacija prepoznaje tri velike grupe limfoidnih neoplazmi: B-stanične neoplazme, T- i NK- neoplazme te hodkinske limfome (Swerdlow, 2008.) Velika heterogenost limfoma rezultat je kompleksnog uređenja i funkcije imunološkog sustava i njegove široke distribucije u mnogim organima, odnosno na visoko specijaliziranim mjestima tih organa. Tome pridonosi i diferencijacija prekursorskih stanica u T-, B- i NK-stanične tipove, kao i kompleksno sazrijevanje preko mnogih progenitorskih staničnih razina te popratne alternacije u ekspresiji gena imunološkog kompleksa gdje postoje brojne mogućnosti za transformirajuće promjene (Williams, 2010.). U ovom seminarskom radu opisani su ne-hodkinski limfomi (NHL) od eng. *non-hodking lymphoma*, NHL koje definiramo kao skupinu limfoidnih neoplazmi koje dijele zajedničko podrijetlo od zrelih, odnosno perifernih, limfoidnih stanica i obuhvaćaju sve limfome osim hodkinskog limfoma (Lenz, 2011.). NHL, stoga, možemo definirati i kao raznoliku grupu malignih limfoma čija je zajednička karakteristika odsutnost velikih Reed-Stenberg stanica koje su karakteristika hodkinskog limfoma (Jaffe, 2008.). Već ovdje vidimo kako je klasifikacija, pa samim time i nazivlje ovih tumora, izrazito kompleksno te se tijekom zadnjih trideset godina učestalo mijenjalo. Neki od pojmova upotrebljivanih u znanstvenim radovima i knjigama ovog područja nisu sinonimi i nastali su u različitim vremenima te su se nastavili upotrebljavati unatoč problematici u nazivlju. U upotrebi je tijekom povijesti bilo više klasifikacija NHL-a (detaljni pregled u Jaffe, 2008.) koje su utjecale na današnje nazivlje, ali danas je općeprihvaćen klasifikacijski sustav koji je objavila Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) 2001. godine, a koji je revidiran 2008. godine (Shaffer, 2008.). Klasifikacijski sistemi primarno su zamišljeni tako da razmatraju najvjerojatniji limfoidni prekursor koji bi fenotipski i genotipski odgovarao malignim stanicama u tumorskom tkivu. Klasifikacije se baziraju na limfocitnoj analizi: površinskih antigena B-, T- ili NK-stanica, potpunog obrasca antigena CD (eng. *clusters of differentiation*) na površini limfocita, pojavi specifičnih histopatoloških karakteristika na rezu tkiva i specifičnim citogenetičkim markerima (Williams, 2010.). Tradicionalno odvojeni klasični hodkinski limfomi i NHL u posljednje vrijeme sve se više preklapaju nakon otkrića

da su hodkinski limfomi porijetlom iz B-stanične linije limfocita (Kuppers, 2006.). Recentnu klasifikaciju limfoma zrelih B-stanica napravio je tim znanstvenika Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *world health organization*) 2008. godine (Tab. 1.). Dobra klasifikacija limfoma bitna je za kvalitetna istraživanja patogeneze B-staničnih limfoma, kao i za dobru dijagnostiku, te konačno što uspješnije liječenje sa što manje negativnih efekata (Kuppers, 2005.). Različiti tipovi B-staničnih limfoma pokazuju izrazito različita klinička ponašanja što dakako zahtijeva i različit pristup u liječenju.

**Tablica 1.** WHO klasifikacija limfoma zrelih B-stanica

| Limfomi zrelih B-stanica                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita                                             |
| Prolimfocitna leukemija B-stanica                                                                |
| Splenični limfom marginalne zone                                                                 |
| Leukemija vlasastih stanica                                                                      |
| Splenični limfom/leukemija, neklasificirano*                                                     |
| Splenični B-malostanični difuzni limfom crvene pulpe                                             |
| Netipična leukemija vlasastih stanica                                                            |
| Limfoplazmocitni limfom                                                                          |
| Walderstromova makroglobulinemija                                                                |
| Bolesti teškog lanca imunoglobulina                                                              |
| α bolest teškog lanca                                                                            |
| γ bolest teškog lanca                                                                            |
| μ bolest teškog lanca                                                                            |
| Plazmastanični mijelom                                                                           |
| Solitarni plazmocitom kosti                                                                      |
| Ekstraostealni plazmocitom                                                                       |
| Ekstranodalni limfom marginalne zone vezan uz limfatično tkivo sluznice (MALT limfom)            |
| Nodalni limfom marginalne zone                                                                   |
| Nodalni limfom marginalne zone u djece                                                           |
| Folikularni limfom                                                                               |
| Folikularni limfom u djece                                                                       |
| Primarni kožni limfom folikularnog centra                                                        |
| Limfom stanica plaštene zone                                                                     |
| Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL), NOS                                                     |
| B-velikostanični limfom bogat T-stanicama/histiocitima                                           |
| Primarni DLBCL centralnog živčanog sustava                                                       |
| Primarni kožni DLBCL, nožni tip                                                                  |
| EBV-pozitivni DLBCL starijih                                                                     |
| DLBCL povezan s kroničnom upalom                                                                 |
| Limfomatozna granulomatoza                                                                       |
| Primarni B-velikostanični limfom medijastinuma                                                   |
| Intravaskularni B-velikostanični limfom                                                          |
| ALK-pozitivni B-velikostanični limfom                                                            |
| Plazmablastični limfom                                                                           |
| B-velikostanični limfom koji nastaje u HHVB-povezanoj multicentričnoj Castelmanovoj bolesti      |
| Primarni efuzijski limfom                                                                        |
| Burkittov limfom                                                                                 |
| Neklasificirani B-stanični limfomi karakteristika između DLBCL-a i Burkittovog limfoma           |
| Neklasificirani B-stanični limfomi karakteristika između DLBCL-a i klasičnog hodgkinskog limfoma |

Neoplazme zrelih B-stanica predstavljaju oko 90% svih limfoidnih neoplazmi u svijetu kod odraslih (Anon, 1997.). Drukčije rečeno, 90% limfoma potječe od stanice koja ima karakteristike specifične za normalne B-stanice, a to se primarno odnosi na površinske antigene CD i preuređivanje imunoglobulinskih gena (Williams, 2010.). Oni predstavljaju oko 4% slučajeva malignih tumora koji se dijagnosticiraju svake godine. Jedini limfomi koji se pojavljuju kod djece sa značajnom frekvencijom su B-velikostanični limfom (DLBCL) i Burkittov limfom. Najčešći tipovi B-staničnih limfoma kod odraslih su folikularni limfom i DLBCL koji zajedno čine oko 60% svih zabilježenih limfoma (Sl. 1.). Učestalost limfoma, osobito B-staničnih limfoma, u svijetu je u porastu i svake godine zabilježi se oko 280 000 novih slučajeva (Stewart, 2003.). Distribucija i učestalost različitih tipova B-staničnih limfoma ovisi o državi u kojoj se rezultati bilježe pa možemo reći da su u različitim dijelovima svijeta često prisutni različiti tipovi limfoma s različitom stopom pojavnosti. Tako su folikularni limfomi izrazito česti u sjevernoj Americi i zapadnoj Europi, a izrazito su rijetki u južnoj Americi, istočnoj Europi, Africi i Aziji. Isto tako, Burkittov limfom je endemičan u ekvatorijalnoj Africi gdje predstavlja najčešću dječju bolest, dok u sjevernoj Americi i zapadnoj Europi čini tek oko 1-2% slučajeva limfoma (Swerdlow, 2008.).



**Slika 1.** Učestalost pojedinih tipova B-staničnih limfoma kod odraslih  
(Preuzeto iz Jaffe, 2008.)

Slično drugim tipovima malignih tumora, B-stanični limfomi rezultat su akumulacije genetičkih aberacija koja funkcionira u mnogo povezanih procesa koji rezultiraju selektivnom prednošću u rastu koju maligni klon ima u odnosu na normalni stanični tip (Lenz, 2011.). Rekurentne translokacije, koje se događaju u različitim fazama diferencijacije B-stanica

obično su inicijalni korak koji vodi u malignu transformaciju. Ove translokacije vode do deregulirane ekspresije onkogeni koji kontroliraju ključne korake u staničnoj proliferaciji, preživljavanju i diferencijaciji. Te translokacije same po sebi nisu dovoljne da bi uzrokovale pojavu limfoma te su sekundarne genetičke aberacije često potrebne kako bi došlo do potpune transformacije B-stanice u tumorsku stanicu (Lenz, 2011.).

Danas se zna da B-stanični limfomi nisu autonomni kao što se prije mislilo, već su faktori ključni za diferencijaciju i preživljavanje normalnih B-stanica ključni i za maligni rast većine B-staničnih limfoma (Kuppers, 2005.). Drugo poglavlje posvećeno je detaljnijem objašnjavanju diferencijacije B-stanica, odnosno staničnog porijekla B-staničnih limfoma, koji potječu iz različitih stupnjeva diferencijacije normalnih B-stanica.

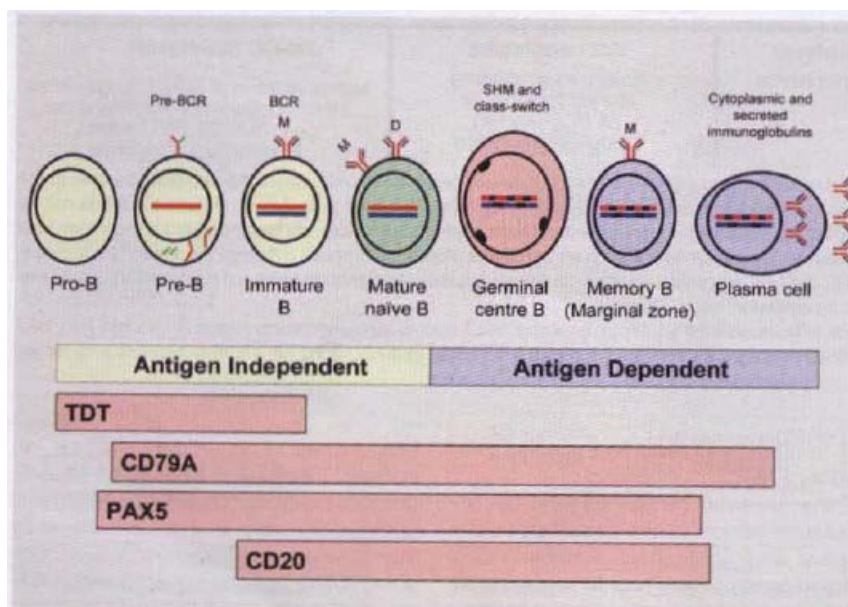
## 2. DIFERENCIJACIJA B-STANICA I STANIČNO PODRIJETLO B-LIMFOMA

### 2.1. Diferencijacija B-stanica

B-stanični limfomi pokazuju karakteristike normalnih razvojnih stadija B-stanica i upravo ova sličnost s normalnim razvojnim stadijima pruža osnovu za klasifikaciju i nomenklaturu ovih tumora iz razloga što su maligne B-stanice zaustavljene u određenoj fazi diferencijacije koja reflektira njihovo stanično podrijetlo (Kuppers, 2005.). Diferencijacija B-stanica događa se u nizu koraka kojekarakterizira struktura B-staničnog receptora (BCR). (Sl. 3.). BCR se sastoji od dva identična teška lanca i dva identična laka lanca imunoglobulinskih (Ig) polipeptida koji su kovalentno povezani disulfidnim mostovima. Stupnjevi u diferencijaciji normalnih B-stanica definirani su primarno serijskim grupiranjem i daljnjom ekspresijom gena za teški i laki lanac imunoglobulinskih gena. Tako prva klasifikacija B-stanica slijedi podjelu u različite razvojne stadije u odnosu na izostanak ekspresije gena za oba imunoglobulinska lanca, na ekspresiju samo teškog lanca ili na ekspresiju gena i za teške i za lake lance imunoglobulina (Janeway, 2005.) (Sl. 2.). Daljnja podjela u prijelazne razvojne stadije temelji se na analizi ekspresije gena za druge površinske stanične proteine, odnosno na temelju direktne DNA analize stanja lokusa za imunoglobulinske gene. Normalna diferencijacija B-stanica kod ljudi počinje u koštanoj srži s prekursorskim stanicama koje nazivamo progenitorske B stanice (B limfoblasti, pro-B stanice koje su prekursori cijele B-stanične linije) i inicirana je prekrajanjem gena za varijabilne regije teških i lakih lanaca antitijela u B-staničnim linijama, u procesu poznatom kao rekombinacija V(D)J (Kuppers, 1999.). U ovome procesu je DNA, koja je locirana između gena koji se prekraju, deletirana s kromosoma (ponekad može biti invertirana). Svaka B-stanica tako generira specifični set gena za varijabilne regije teških i lakih lanaca koji se razlikuju od istih setova drugih B-stanica te stoga svaka stanica producira na svojoj površini drugo antitijelo (Kuppers, 1999.). Ovaj rearanžman gena oprema i svaku B-stanicu s individualnim, molekularnim klonalnim markerima koji su ključni za definiranje stadija u diferencijaciji, a posljedično i za klasifikaciju B-staničnih limfoma. Nakon uspješne ekspresije citoplazmatskog  $\mu$  teškog lanca stanicu definiramo kao pre-B stanicu, a nakon uspješne ekspresije IgM u sljedećem koraku na površini stanice, stanicu možemo definirati kao nezrelu B-stanicu (IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>) (Janeway, 2005.). Sav ovaj razvojni niz odvija se u koštanoj srži i neovisan je o antigenu (eng. *antigen-independent*).

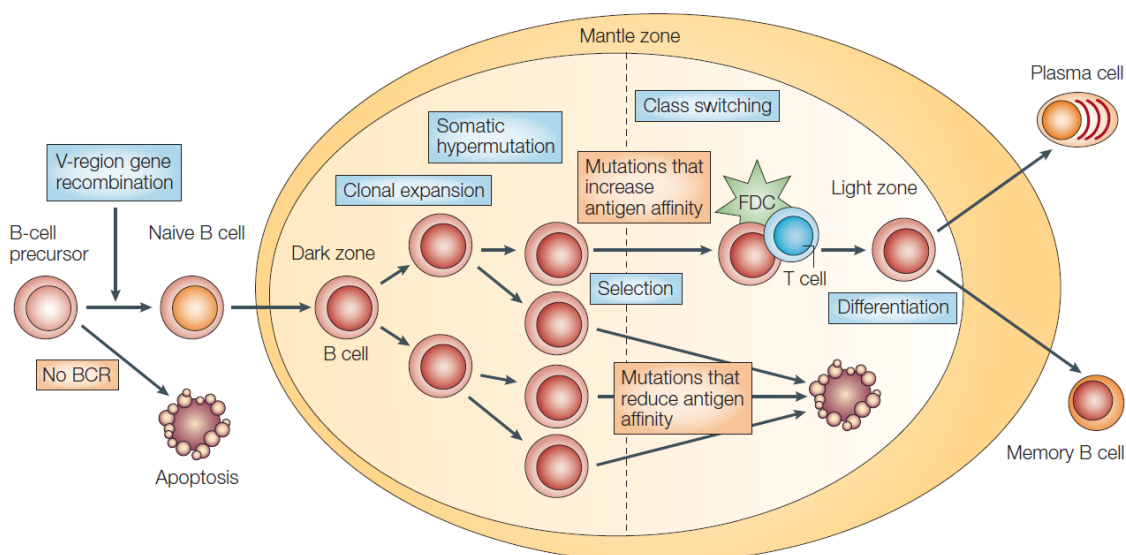
Ekspresija antijela kao antigenskog receptora na površini B-stanica ključna je za razvoj i preživljavanje B-stanica. U razvoju, stanica prolazi kroz uređeni program V(D)J

rekombinacija u kojem preživljavaju samo one stanice koje imaju gene za teške i lake Ig lance tako uređene da se isti mogu translirati u proteine, što je najčešće posljedica očuvanja točnog okvira čitanja. Sve stanice koje nemaju dobar okvir čitanja (eng. *out of frame V(D)J*) umiru apoptotskim putem (Rajewski, 1996.). Uz ekspresiju antigenskih receptora za preživljavanje B-stanica tijekom njihove diferencijacije ključna je specifičnost tih istih receptora. Tako u koštanoj srži one B-stanice čija ekspresija rezultira autoreaktivnim receptorima su ili uklonjeni apoptotskim putem ili prolaze kroz novo uređivanje receptora, odnosno sekundarnu V(D)J rekombinaciju (Kuppers, 1999.). B-stanice koje su uspješno eksprimirale na svojoj površini naivni B-stanični receptor (onaj koji još nije izložen antigenu) napuštaju koštanu srž nastavljajući svoju diferencijaciju. Ukoliko uspiju preživjeti u perifernom limfatičkom tkivu, diferenciraju se u zrele, naivne B-stanice koje na svojoj površini eksprimiraju imunoglobulin M i imunoglobulin D (IgM+, IgD+) (Janeway, 2005.). Naivne B-stanice čine oko 60% svih B-stanica koje cirkuliraju u perifernoj krvi (Klein, 1998.). Uz ekspresiju imunoglobulinskih gena, kako B-stanica prolazi kroz diferencijaciju, mijenja se ekspresija i mnogih drugih proteinskih gena, pogotovo onih koji kodiraju površinske stanične proteine pa se ekspresijski obrazac tih diferencijacijskih markera koristi za identifikaciju različitih razvojnih stadija B-stanica, odnosno za analizu staničnog porijekla B-staničnog limfoma (Kuppers, 2005.). Primjer su molekule CD79A i CD79B koje sadrže citoplazmatske imunoreceptorske tirozin-bazirane aktivacijske motive koji prenose signal nakon uspješnog spajanja BCR (eng. *BCR-crosslinking*).



**Slika 2.** Imunofenotip B-limfocita u različitim fazama sazrijevanja  
(Preuzeto iz Jaffe, 2008.)

Naivne B-stanice, koje su obično CD5+, su mali mirujući limfociti koji cirkuliraju u perifernoj krvi (PB, od eng. *peripheral blood*), nalaze se u primarnim limfoidnim folikulima i plaštenim zonama folikula (tzv. recirkulirajuće B-stanice). Naivne B-stanice mogu prepoznati antigen membranski vezanim receptorom (BCR) na površini i vezanjem takvog antigena se aktiviraju te mogu sudjelovati u imunološkom odgovoru. Aktivirane B-stanice mogu diferencirati u plazma stanice koje produciraju rani IgM imunološki odgovor na antigen bez kontakta s T-stanicama. Takav imunološki odgovor koji je neovisan o T-stanicama događa se izvan germinalnih centara (ekstrafolikularno). U imunološkom odgovoru ovisnom o T-stanicama koji je važniji za razvoj B-staničnih limfoma, B-stanice aktivirane antigenom skupljaju se u centrima primarnih folikula sekundarnih limfatičnih organa kao što su limfni čvorovi, slezena ili limfatično tkivo sluznice (MALT, od eng. *mucosis associated lymphonic tissue*) odnosno u Peyerovim pločama i tonzilama gdje ispunjavaju mrežu folikularnih dendritičkih stanica (FDC, od eng. *follicular dendritic cells*) i formiraju germinalni centar (GC). Aktivirane B-stanice u tim strukturama prolaze klonalnu ekspanziju tako što im se IgG geni modificiraju u procesu somatske hipermutacije (SHM, od eng. *somatic hyper-mutation*), odnosno u procesu *class-switch* rekombinacije (CSR, od eng. *class-switch recombination*) (Favera, 2008.). SRM predstavlja proces u kojem se mutacije (primarno promjene jednog nukleotida, ali često i delecije i duplikacije) uvode u varijabilne regije Ig gena (IgV) u visokoj frekvenciji u B-stanici tijekom imunološkog odgovora na antigen. Kao rezultat ovog procesa, B-stanice u germinalnim centrima produciraju antijela koja imaju veći afinitet za antigen od nativnih Ig gena pa prolaze kroz pozitivnu selekciju i preživljavaju. Suprotno tomu, stanice koje produciraju nefunkcionalno antitijelo ili antitijelo sa smanjenim afinitetom za antigen, kojih je zapravo mnogo više od onih koje uspiju producirati antigen s većim afinitetom, prolaze kroz negativnu selekciju i konačno apoptozu. Stanice koje eksprimiraju poželjno antitijelo, odnosno ono s povećanim afinitetom, otpuštaju se u periferni sustav kao plazma stanice i dugoživeće memorijske B-stanice (Kuppers, 1999.). Konačno, neke B-stanice u germinalnim centrima mijenjaju ekspresiju IgM i IgD kako bi eksprimirale teške lance drugih klasa imunoglobulina: IgG, IgA ili IgE u procesu CSR (Lie, 1996.). Ovaj proces rezultira promjenom efektorskih funkcija antijela, ali ostavlja V(D)J regije, odnosno specifičnost antijela, netaknutom. Proliferirajuće B-stanice germinalnog centra (GC-stanice) koje prolaze SHM često se nazivaju centroblasti, a njihovi potomci koji prolaze kroz selekciju i CSR nazivaju se centrociti (Favera, 2008.). Opisani proces diferencijacije B-stanica prikazan je shematski na slici 3.



**Slika 3.** Diferencijacija B-stanica i reakcija u germinalnim centrima  
(preuzeto iz Kuppers, 2005.)

## 2.2. Podrijetlo B-staničnih limfoma

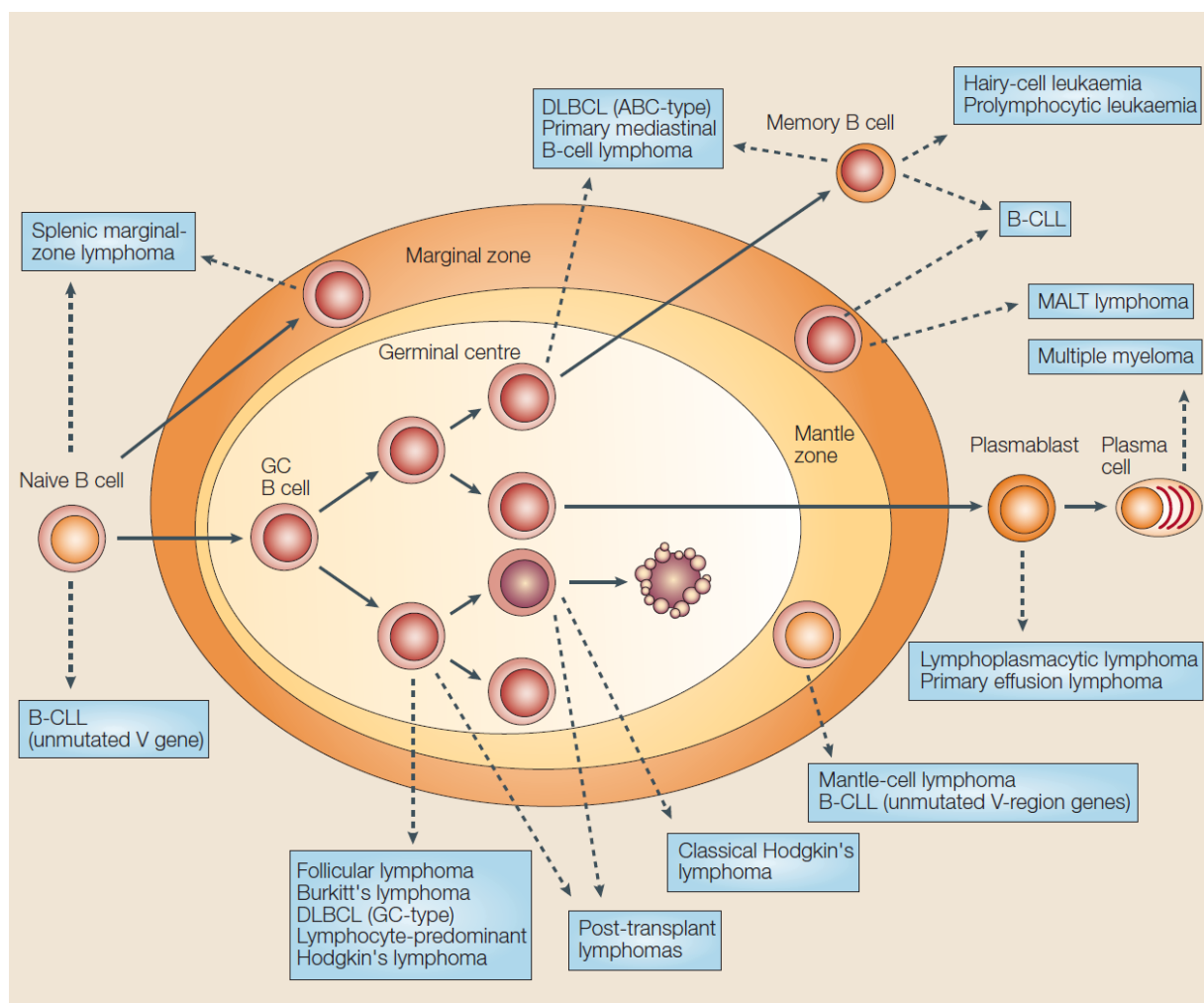
Imunofenotipska i genotipska istraživanja malignih B-stanica devedesetih godina pokazala su da većina B-staničnih limfoma potječe od GC-stanica ili post-GC stanica (odnosno memorijskih stanica) (Stevenson, 2001.) (Sl. 4.). Analiza varijabilne regije Ig gena (IgV) malignih limfocita u B-limfomima pokazale je da su one gotovo uvijek prošle proces SHM-a u germinalnim centrima što ukazuje na to da su zarobljene kao GC stanice ili su u kasnijoj diferencijaciji ostale zarobljene kao post-GC stanice (Kuppers, 1999.). Drugi marker koji je često zapažen u većini limfoma je mutacija gena *BCL6* (BCL, eng. *B-cell lymphoma 6*), a budući da je *BCL6* također podložan mutacijama u germinalnom centru, premda s nižom frekvencijom od IgV, potvrđeno je GC ili post-GC stanično podrijetlo. *BCL6* je nuklearni fosfoprotein koji pripada u BTB/POZ porodicu transkripcijskih faktora koji imaju strukturu cinkovih-prstena, a specifično je eksprimiran u GC stanicama i nužan je za GC formaciju, dok ga u naivnim B-stanicama nema, a u plazma i memorijskim stanicama je prestala njegova ekspresija (Favera, 2008.). Još jedan od GC markera je ekspresija membranske metaloendopeptidaze CD10. Postoje i mnogi drugi markeri kojima se stanice mogu karakterizirati i klasificirati (Tab. 2.).

Drugi dokazi GC/post-GC podrijetla većine limfoma su kromosomske translokacije i aberantni proces SHM koji predstavljaju pogreške, odnosno poremećaje u mehanizmima prekrajanja imunoglobulinskih gena (Favera, 2008.). Analiza somatskih mutacija može razdvojiti GC podrijetlo od post-GC podrijetla. Tako su u folikularnim limfomima prisutne

kontinuirane somatske mutacije u tumorskom klonu što bi, uz folikularni uzorak rasta ovih limfoma, sugeriralo da su folikularni limfomi tumori GC B-stanica. Kontinuirane somatske mutacije unutar tumorskog klona prisutne su i u limfoplazmacitoidnim limfomima, većini sporadičnih i endemičnih Burkittovh limfoma, većini difuznih b-velikostaničnih limfoma (DLBCL, od eng. *diffuse large B-cells lymphoma*, GC-tip) i rijetkim MALT limfomima (Kuppers, 1999., Jaffe, 2008.). Burkittov limfom i DLBCL odgovaraju brzo proliferirajućim stanicama i oba su klinički izrazito agresivni limfomi (Jaffe, 2008.). Limfomi marginalne zone, odnosno MALT, splenični i nodalni tipovi limfoma predstavljaju post-germinalni tip, memorijski B-stanični tip ili tip marginalne zone koji su podrijetlom iz ektranodalnih, spleničnih ili nodalnih tkiva i najčešće u njima specifično proliferiraju (Shaffer, 2008.). S druge strane, limfomi stanica plaštene zone (MCL, eng. *mantle-cell lymphoma*) i neke B-stanične kronične limfocitne leukemije (B-CLL) nemaju markere karakteristične za GC ili post-GC stanice, odnosno nemaju IgV mutacije karakteristične za stanice koje su prošle SHM, već se danas smatra da isti odgovaraju CD5+ naivnim B-stanicama, odnosno stanicama koje nisu prošle kroz germinalne centre. Ipak, 20-30% slučajeva MCL i 50% slučajeva B-CLL nose mutirane V-regije gena, što indicira da su prošli kroz GC reakciju (Kuppers, 1999., Kuppers, 2005.). Splenični B-stanični limfomi marginalne zone uključuju B-stanice folikularne i marginalne zone i obično nose nemutirane varijabilne (V)- regije Ig gena. Ovi limfomi, stoga, mogu biti podrijetlom od naivnih B-stanica koje imaju tendenciju diferencijacije u marginalnoj zoni. Post-transplantacijski limfomi, koji se obično razvijaju u pacijenata nakon transplantacije organa, obično su podrijetlom od GC B-stanica koje su prošle selekciju antigena i eksprimiraju BCR, dok drugi mogu biti derivirani iz pre-apoptotičkih GC B-stanica (Capello, 2003., Kuppers, 2005., Shaffer, 2002.). Za primarne medijastinalne B-stanične limfome vjeruje se da su podrijetlom od post-GC B-stanica timusa, a važan je ABC (eng. *active B-cells*) tip DLBCL za kojeg se vjeruje da je podrijetlom od aktiviranih B-stanica (Kuppers, 2005.). Kada govorimo o staničnom podrijetlu B-staničnih limfoma (eng. *cell of origin*), prisiljeni smo govoriti o odnosu između fenotipa tumora u njegovoj kliničkoj slici i normalnoj fazi B-stanice tijekom diferencijacije. To može voditi do netočne interpretacije, budući da ne možemo promatrati B-stanične limfome tijekom njihove prirodne evolucije, tj. transformacije iz normalnih B-stanica. Stoga se onkogene translokacije, kao najčešći transformirajući događaji, mogu dogoditi i u ranijoj fazi diferencijacije B-stanica nakon koje transformirana stanica nastavlja s diferencijacijom i tek je kasnije akumulacijom dodatnih aberacija tzv. onkogenih udaraca (eng. *oncogenic hits*) zaustavljena u diferencijaciji pa ostvaruje potencijal rasta i razvoja dobiven transformacijom (Shaffer, 2002., Shaffer 2012.). Upravo zato neki autori (Shaffer, 2012.) ne preporučuju upotrebu ovog termina prilikom

objašnjavanja razvoja B-staničnih limfoma. Primjer zašto su neki autori protiv upotrebe pojma *podrijetlo* je slučaj kronične limfocitne leukemije B-stanica za koju se misli da ima podrijetlo od hematopoetskih matičnih stanica (HSC). U pokusima u kojima su imunodeficientni miševi primali HSC-e iz B-CLL pacijenata razvio se klasični CLL fenotip stanica što je sugeriralo da CLL HSC-e nose određenu genetičku ili epigenetičku predispoziciju za razvoj limfoma zrelih B-stanica (Kikushige, 2011.). Sličan primjer vidljiv je kod folikularnih limfoma kod kojih je t(14:18) translokacija koja ih definira uzrokovana RAG rekombinazom koja je aktivna u pre-B stanicama, a nije aktivna u zrelim B stanicama, iako limfociti folikularnog limfoma imaju imunofenotip karakterističan GC stanicama (Shaffer, 2012.).

U sljedećem poglavlju detaljnije su objašnjeni transformirajući događaji, odnosno onkogene lezije na staničnoj i molekularnoj razini, koje su spomenute i u ovom poglavlju, a koje mogu voditi do poremećaja normalnih staničnih mehanizama proliferacije, diferencijacije i apoptoze te konačno do transformacije B-limfocita u maligne stanične tipove.



**Slika 4.** Stanično podrijetlo ljudskih B-staničnih limfoma. Pune linije predstavljaju put diferencijacije normalnih B-limfocita, a isprekidane linije predloženo podrijetlo nekih B-staničnih limfoma.

(prilagođeno prema Kuppers, 2005).

**Tablica 2.** Pregled najvažnijih karakteristika diferencijacije B-limfocita s pripadajućim skupinama limfoma koji su opisani u drugom poglavlju

|                                    | B-stanice                                     | Imunoglobulinski geni                       | Somatske mutacije           | Imunoglobulinski proteini             | Markeri                                    | Pripadajući limfomi                                                    | Zahvaćena tkiva            |
|------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Neovisni o stranom antigenu</b> | Matične stanice                               | Linija matičnih stanica                     | Nema                        | Nema                                  | CD34                                       | B-LBL/ALL                                                              | Koštana srž                |
|                                    | Pro B-stanice                                 | Linija matičnih stanica                     | Nema                        | Nema                                  | CD19, CD79a, BSAP, CD34, CD10, TdT         | B-LBL/ALL                                                              | Koštana srž                |
|                                    | Pre B-stanice                                 | IgH preuređenje $\mu$ lanca (citoplazma)    | Nema                        | Ig $\mu$                              | CD19, CD45R, CD79a, BSAP, CD34, CD10, TdT  | B-LBL/ALL                                                              | Koštana srž                |
|                                    | Nezrele B-stanice                             | IgL/IgH preuređenja, IgM i IgD (membrana)   | Nema                        | IgM (membrana)                        | CD19, CD20, CD45R, CD79a, CD10, BSAP       | B-LBL/ALL                                                              | Koštana srž                |
| <b>Ovisni o stranom antigenu</b>   | Zrele naivne B-stanice                        | IgL/IgH preuređenja, IgM i IgD (membrana)   | Nema                        | IgM/IgD                               | CD19, CD20, CD45R, CD79a, BSAP, CD5        | B-CLL, MCL                                                             | Periferna limfatična tkiva |
|                                    | Germinalni centar (centrociti i centroblasti) | IgL/IgH preuređenja, promjena razreda (CSR) | Uvođenje somatskih mutacija | Imunoglobulin (minimalan ili odsutan) | CD19, CD20, CD45R, CD79a, BSAP, CD10, BCL6 | Burkittov limfom, limfom folikularnih stanica, B-velikostanični limfom | Periferna limfatična tkiva |
|                                    | Memorijske B-stanice                          | IgL/IgH preuređenja                         | Somatske mutacije           | IgM                                   | CD19, CD20, CD45R, CD79a, BSAP             | Limfom marginalne zone, B-kronična limfocitična leukemija              | Periferna limfatična tkiva |
| <b>Terminalno diferencirane</b>    | Plazma stanice                                | IgL/IgH preuređenja                         | Somatske mutacije           | IgG>IgA>IgD                           | CD38, Vs38x, MUM-1CD138                    | Plazmocitom/mijelom                                                    | Periferna limfatična tkiva |

### 3. MEHANIZMI TRANSFORMACIJE B-STANIČNIH LIMFOMA

Za razumijevanje mehanizama transformacije B-stanica koje vode u nastanak B-staničnog limfoma, potrebno je razumjeti kako je normalna diferencijacija B-stanica, opisana u drugome poglavlju, u određenom smislu potencijalna za tu istu stanicu katastrofa (Shaffer, 2002.). Snažna klonalna ekspanzija germinalnih B-stanica, koja je ključna za normalni imunološki odgovor na antigen, sama po sebi predstavlja veliki rizik koji lako može dovesti do maligne transformacije. Budući da ova proliferativna ekspanzija ovisi o procesima koji modificiraju DNA GC-stanica i uključuju dvostruke lomove i točkaste mutacije: VDJR, SHM, CSR, povremene pogreške u kontroli ovih procesa dovode do generacije kromosomskih translokacija ili rjeđe delecija i insercija u imunoglobulinskim genskim lokusima koje konačno mogu voditi u B-staničnu tumorogenezu (Kuppers, 1999.). Upravo podatak da se SHM i CSR odvijaju uglavnom u germinalnim centrima može objasniti prije spomenutu činjenicu da je većina B-staničnih limfoma podrijetlom od GC-B-stanica ili njihovih potomaka (Kuppers, 2005.). Također, činjenica da DNA T-stanica ne prolazi kroz procese SHM i CSR može objasniti naizgled neobičnu činjenicu da su B-stanice podložnije malignoj transformaciji, odnosno činjenicu da je 90% dijagnosticiranih limfoma podrijetlom iz B-stanične linije (Kuppers, 2001.). Za razumijevanje mehanizama transformacije B-limfocita bilo je važno otkriće da mnoge B-stanice u normalnim, odnosno zdravim miševima i ljudima nose kromosomske translokacije koje uključuju Ig lokuse. Tako su, na primjer, B-stanice koje nose *IGH/BCL2* translokaciju pronađene u jednoj od  $10^4$  do  $10^6$  B-stanica, a *IGH/c-MYC* translokacije u jednoj od  $10^6$  stanica i detektirane su kod 2% zdravih ljudi u populaciji (Roschke, 1997.). Transformacija B-stanica proces je, dakle, koji uključuje više koraka, u kojoj su kromosomske translokacije koje uključuju Ig lokus, najčešće samo inicijalni događaji koji sami nisu dovoljni za transformaciju B-stanica u maligne klonove. Ove su translokacije, iako samo inicijalni događaji u transformaciji, ključni za određivanje tipa limfoma koji će eventualno nastati iz stanice koja nosi tu translokaciju (Kuppers, 2001.). Ono što se događa u gotovo svim neoplazmama kod ljudi, pa tako i u slučaju NHL-a, jesu genomske lezije koje uključuju proto-onkogene, tumor-supresorske gene i u nešto manjoj mjeri virusne infekcije. Gotovo svi proto-onkogeni koji su uključeni u razvoj NHL-a su transkripcijski faktori ili anti-apoptotski geni: *BCL2*, ciklin D1, *BCL6*, *c-MYC*, itd. (Gaidano, 1995.). Što se tiče tumor supresorskih putova, čija je funkcija u razvoju limfoma otkrivena mnogo kasnije, kombinirana analiza  $p16^{\text{INK4a}}$ -Rb  $P14^{\text{ARF}}$ -P53 i  $P27^{\text{KIP1}}$ -CDK2 putova otkrila je simultanu inaktivaciju više regulatora staničnog ciklusa kod više tipova limfoma koji tako daju prednost tumoru u rastu i preživljavanju (Sanchez-Beato, 2003.). Uloga virusa u

transformaciji B-stanica, najpoznatija je u primjere Epstein-Barr virusa (EBV) koji se može pronaći u gotovo svim endemičnim Burkittovim limfomima, u mnogim post-transplantacijskim i primarnim efuzijskim limfoma i u oko 40% slučajeva klasičnog hodkinskog limfoma (Kuppers, 2005.). Drugi virusi koji su uključeni u transformaciju B-limfocita su humani herpes virus 8 (HHV-8) koji se povezuje s patogeneom primarnog efuzijskog limfoma te virus hepatitisa B i C u DLBCL-u, folikularnim limfomima te spleničnim limfomima marginalne zone (Williams, 2010.). Bakterijske infekcije koje su uključene uneoplastičnu transformaciju B-stanice su *Helicobacter pylori* u slučajevima MALT limfoma te *Chlamydia psittaci* u slučajevima okularnog adneksalnog limfoma (Williams, 2010.). Također, mnoge imunosupresijske naslijeđene i stečene bolesti, pri čemu su najčešće infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV), kao i mnoge autoimune bolesti, povezane su s povećanim rizikom od limfoma, osobito DLBCL-a i Burkittovog limfoma (Swerdlow, 2003.). Balansirane kromosomske translokacije, koje su prije spomenute, a koje uključuju imunoglobulinske gene (Ig) i niz drugih gena od kojih su najčeći proto-onkogeni, često se spominju kao jedna od osnovnih karakteristika većine limfoma zrelih B-stanica (Kuppers, 2001.) (Tab. 3.).

**Tablica 3.** Kromosomske translokacije u B-staničnim limfomima

| Histološki tip NHL-a                   | Opažena translokacija                                      | Postotak slučajeva | Uključeni proto-onkogen                  | Mehanizam aktivacije proto-onkogen             | Funkcija proto-onkogen                                                         |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Limfoplazmocitni limfom</b>         | t(9;14)(p13;q32)                                           | 50%                | <i>PAX5</i>                              | Deregulacija transkripcije                     | Transkripcijski faktor koji regulira proliferaciju i diferencijaciju B-stanica |
| <b>Folikularni limfom</b>              | t(14;18)(q32;q21)<br>t(2;18)(p11;q21)<br>t(18;22)(q21;q11) | 80-90%             | <i>BCL2</i>                              | Deregulacija transkripcije                     | Negativni regulator apoptoze                                                   |
| <b>Limfom stanica plaštene zone</b>    | t(11;14)(q13;q32)                                          | 70%                | <i>BCL1</i> /ciklin D1                   | Deregulacija transkripcije                     | Regulator staničnog ciklusa                                                    |
| <b>MALT limfom</b>                     | t(11;18)(q21;q21)<br>t(1;14)(p22;q32)                      | 50%<br>Rijetki     | <i>API2</i> / <i>MLT</i><br><i>BCL10</i> | Fuzijski protein<br>Deregulacija transkripcije | Antiapoptotski faktor<br>Antiapoptotski faktor                                 |
| <b>Difuzni B-velikostanični limfom</b> | der(3)(q27)                                                | 35%                | <i>BCL6</i>                              | Deregulacija transkripcije                     | Represor transkripcije                                                         |
| <b>Burkittov limfom</b>                | t(8;14)(q24;q32)<br>t(2;8)(p11;q24)<br>t(8;22)(q24;q11)    | 80%<br>15%<br>5%   | <i>c-MYC</i>                             | Deregulacija transkripcije                     | Transkripcijski faktor koji regulira proliferaciju i rast                      |
| <b>Anaplastični T-</b>                 | t(2;5)(p23;q35)                                            | 60%                | <i>NPM</i> / <i>ALK</i>                  | Fuzijski protein                               | ALK je tirozin                                                                 |

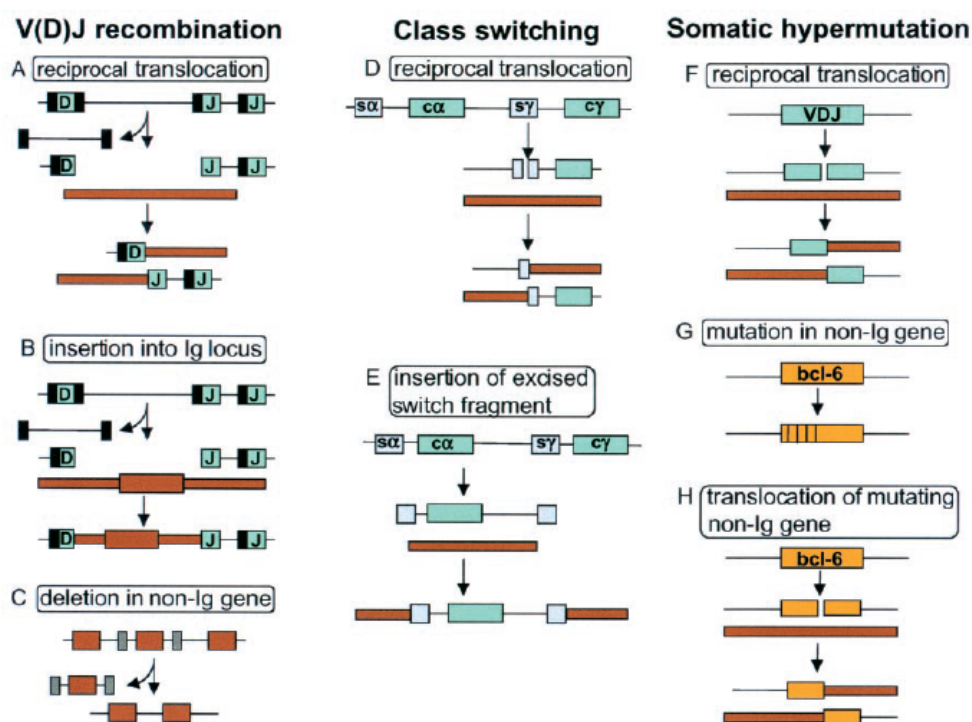
Kao posljedica ovakvih translokacija, proto-onkogen dolazi pod kontrolu aktivnog Ig lokusa što uzrokuje dereguliranu, konstitutivnu ekspresiju proto-onkogeno koji tako postaje onkogen (Willis, 2000.). Poznatiji primjeri translokacija su *IGH/BCL1* translokacija u limfomima stanica plaštene zone, *IGH/BCL2* translokacija u folikularnim limfomima te *IGH/c-MYC* translokacija u Burkittovim limfomima (Kuppers, 2001). Posljedice koje nastaju uslijed konstitutivne ekspresije navedenih onkogeno mogu se pretpostaviti na temelju normalne funkcije njihovih proteinskih produkata čija je uloga u tom slučaju povećana. Tako je *BCL1* (ciklin D1) uključen u kontrolu staničnog ciklusa, *BCL2* je inhibitor apoptoze, a *c-MYC* je jedan od glavnih regulatornih proteina u procesima staničnog rasta (Kuppers, 2001).

Postoje 3 tipa translokacija unutar Ig lokusa kod B-staničnih limfoma koji se definiraju s obzirom na proces čijim su aberantnim dijelovanjem nastali (Kuppers, 2005.). Prvi tip translokacija ima translokacijske točke loma koji su direktno uz J-regiju ( $J_H$ ) genskih segmenata Ig teških lanaca i nalaze se uz mjesta gdje se D-regije ( $D_H$ ) Ig teških lanaca združuju s J-regijom ( $D_HJ_H$ ). Kako ovi lomovi često pokazuju gubitak nukleotida na krajevima  $J_H$  i  $D_H$  segmenata kao i dodatne nukleotide kojih nema u inicijalnim staničnim linijama, a što je tipično za proces V(D)J rekombinacije, vrlo je vjerojatno da su ove translokacije posljedica pogrešaka tijekom V(D) rekombinacije koja se događa vrlo rano u razvoju B-stanica i koja uključuje RAG-katalizirano uvođenje DNA lomova unutar Ig lokusa (Kuppers, 2005.) (Sl. 9.) Poznatiji primjeri translokacija ovog tipa su t(11;14), translokacija *IGH/BCL1* u limfomima stanica plaštene zone, t(14;18), translokacija *IGH/BCL* u folikularnim limfomima, t(1;14), *IGH/BCL9* u akutnim limfoblastičnim limfomima i t(11;14), translokacija *IGH/BCL10* u MALT limfomima (Kuppers, 2001.) (Tab.4.). U drugom tipu translokacija, lomovi su pronađeni uz rearanžirane V(D)J gene i ove V-regije gena uvijek su somatski mutirane. Ovi, kao i neki drugi pokazatelji, indiciraju da takve translokacije nastaju kao nusprodukti procesa somatske hipermutacije koji se povezuje s dvostrukim lomovima u molekuli DNA (Kuppers, 2001.) (Sl.9.). Taj tip translokacija opažen je u *IGH/c-MYC* ili *IGL/c-MYC* translokacijama koje su karakteristika BL, kao i nekim translokacijama gena *BCL6* koje su karakteristika DLBCL-a kao i IgG Fc receptor u translokacijama koje su karakteristika folikularnih limfoma. SHM proces je, osim u generiranje kromosomskih translokacija Ig lokusa, uključen i u generiranje mutacija u translociranom i normalnom alelu gena *BCL6* što je jedna od značajnih karakteristika DLBCL-a, kao i u generiranje inaktivirajućih mutacija u genima *CD95* (*FAS*) koje se pojavljuju u oko 20% post GC B-

staničnih limfoma (Kuppers, 2001.). Tako ovaj proces hipermutacije može promovirati limfomagenezu ciljajući regulatorne i kodirajuće sekvence proto-onkogen *BCL6* i tumor-supresorskog gena *CD95* što rezultira u desreguliranom ekspresijom gena u slučaju *BCL6*, odnosno u gubitku funkcije gena u slučaju *CD95* (Kuppers, 2005.). Mutacije ovih gena opažene su i u oko 30% normalnih GC i memorisjkih B-stanica u frekvenciji koja je oko 50 puta niža od one koja zahvaća rearanžirane  $V_H$  gene. Također, u mnogim slučajevima DLBCL-a zapažene su aberantne hipermutacije i u mnogim drugim proto-onkogenima kao što su *c-MYC*, *PAX5*, *Rho/TTF*, *pim-1*, itd. (Kuppers, 2001.). Treći tip translokacija karakteriziran je lomovima u IgH konstantnim *switch* regijama, u kojima su lomovi u DNA uvedeni tijekom procesa rekombinacije koja mijenja imunoglobulinski razred (CSR) (Kuppers, 2005.). Translokacije koje se povezuju s ovim tipom su *IGH/c-MYC* t(14;18) translokacija u sporadičnim Burkittovim limfomima, *IGH/BCL3* t(14;19) translokacija u B-CLL, *IGH/BCL6* t(3;14) translokacija u DLBCL, *IGH/PAX-5* t(9;14) u mnogim limfoplastocitoidnim limfomima i mnoge druge (Kuppers, 2001.) (Sl. 5.). Osim translokacija, aberantni CSR proces može voditi i do promjena u ekspresiji onkogen preko insercijskih događaja kao što je slučaj u nekim multiplim mijelomima (Sl. 5.). Iako se većina translokacija događa kao posljedica pogreške u somatskoj hipermutaciji ili CS rekombinaciji imunoglobulina (tip II i III), odnosno u procesima koji se događaju u germinalnim centrima i katalizirani su enzimom AID (*activation-induced cytidine deaminase*) specifičnim za B-stanice, postoje i iznimke poput t(14;18) kromosomske translokacije koja uključuje imunoglobulinski lokus i *BCL2* lokus u folikularnim limfomima kao i veći broj translokacija t(8;14) koje uključuju imunoglobulinski i *MYC* lokus u endemskom tipu Burkittovog limfoma. Danas se smatra da navedene translokacije predstavljaju pogreške tijekom procesa V(D)J rekombinacije, odnosno da nastaju u nezrelim pre-GC-B stanicama gdje su katalizirane su enzimima RAG1 (*recombination activating gene 1*) i RAG2 (*recombination activating gene 1*) (Favera, 2008). Iako su kromosomske translokacije koje uključuju Ig lokus glavna karakteristika B-staničnih limfoma, mnogi drugi transformirajući događaji su često uključeni u patogenezu samog limfoma, kao što su mutacije u tumor-supresorskim genima (npr. *TP53*), genomske amplifikacije (npr. *REL*) i translokacije koje ne uključuju Ig lokus (npr. *API2-MALT1*) (Kuppers, 2005.) (Tab. 4., Sl. 5.).

**Tablica 4.** Genetičke aberacije u B-staničnim tumorima koje nastaju kao rezultat pogrešaka u specifičnim procesima koji modificiraju Ig-gene s primjerima i referencama

| Mehanizam                     | Tip molekularnog procesa                                | Primjer                                                                                                                                  | Reference                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>V(D)J rekombinacija</b>    | (i) translokacija onkogene na lokus Ig (D)J             | - <i>bcl-1/IgH</i> u MZL-u<br>- <i>bcl-2/IgH</i> u FL-u                                                                                  | (Bakhshi et al., 1987; Cotter et al., 1990; Jaeger et al., 2000; Tsujimoto et al., 1988) (Aplan et al., 1990; Brown et al., 1990; Cayuela et al., 1997) (Vaandrager et al., 2000) |
|                               | (ii) delecija u onkogenima ili tumor-supresor genima    | - <i>TAL 1</i> i <i>MTS1</i> u T-staničnim leukemijama                                                                                   |                                                                                                                                                                                   |
|                               | (iii) transpozicija gena u Ig lokusa                    | - <i>bcl-2</i> u FL-u                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                   |
| <b>Ig promjena razreda</b>    | (i) translokacija onkogene u IgH 'switch' regiju        | - <i>bcl-3/IgH</i> u B-CLL-u<br>- <i>bcl-6/IgH</i> u DLCL-u                                                                              | (Chesi et al., 1997; Gelmann et al., 1983; Ohno et al., 1993; Showe et al., 1985; Baron et al., 1993; Ye et al., 1993) (Gabrea et al., 1999)                                      |
|                               | (ii) insercija izrezane 'switch' sekvence u drugi lokus | - <i>c-myc/IgH</i> u BL-u<br>- <i>FGFR/IgH</i> u MM-u<br>- insercija unutar ciklina D1 u MM                                              |                                                                                                                                                                                   |
| <b>Somatska hipermutacija</b> | (i) translokacija onkogene u preuređene V -gene         | - <i>c-myc/IgH</i> u BL-u<br>- <i>bcl-6/IgH</i> u DLCL-u                                                                                 | Roth and Craig (1998) (Migliazza et al., 1995; Muëschen et al., 2000b; Pasqualucci et al., 1998; Shen et al., 1998; Pasqualucci et al., 2001) (Pasqualucci et al., 2001)          |
|                               | (ii) somatska mutacija u ne-Ig genu                     | - <i>bcl-6</i> , <i>CD95/Fas</i> u različitim NHL-ovima                                                                                  |                                                                                                                                                                                   |
|                               | (iii) translokacija mutiranih onkogene                  | - <i>Pax-5</i> , <i>c-myc</i> , <i>Pim-1</i> , <i>Rho/TTF</i> , in DLCL<br>- <i>bcl-6</i> , <i>Pax-5</i> , <i>Pim-1</i> , <i>Rho/TTF</i> |                                                                                                                                                                                   |



**Slika 5.** Proces koji remodeliraju Ig-gene, a uključeni su u tumorogenezu B-staničnih limfoma

Opisane kromosomske translokacije, amplifikacije, mutacije i delecije koje se događaju u B-staničnim limfomima mogu poremetiti normalnu B-staničnu homeostazu na 3 načina: poticanjem staničnog rasta i proliferacije, blokiranjem apoptoze i blokiranjem diferencijacije (Shaffer, 2002.). Analiza normalne GC B-stanične genske ekspresije omogućuje opisivanje mehanizama kojima bi ovi onkogeni događaji mogli poremetiti normalnu B-staničnu diferencijaciju koja bi transformiranim stanicama dala selektivnu prednost pred normalnim B-stanicama. GC B-stanice poznate su kao jedne od stanica koje najbrže proliferiraju i njihov broj se udostručava svakih 7 sati (MacLennan, 1994.), a analiza genske ekspresije ovih stanica otkrila je kako iste pokazuju visoku ekspresiju gena koji potiču brzo napredovanje u staničnog ciklusa, posebno G2/M fazu staničnog ciklusa. Primjeri takvih gena su *CDC2* (*cell-division cycle 2*), *PLK* (*polo-like kinase*) i *BUB1* (*budding uninhibited by benzimidazoles 1 homologue*). Zanimljivo je kako su geni koji kontroliraju stanični nisko eksprimirani na u GC B-stanicama. Neki od tih gena kodiraju za proteinsku translacijsku aparaturu (ribosomski proteini i translacijski inicijacijski faktori) i gene intermedijarnog metabolizma (npr. glikolitični enzimi). Mnogi od ovih gena su pod kontrolom transkripcijskog faktora c-MYC (Levens, 2002.). Iako GC B-stanice eksprimiraju c-MYC, eksprimiraju puno niže razine c-MYC mRNA nego druge stanice u diobi. Takvo favoriziranje proliferacije nad rastom kod GC B-stanica čini se prilagodbom na mehanizme pozitivne i negativne selekcije koja je uključena u normalni razvoj GC B-stanice čime ona izrazito brzo može povećati broj, odnosno *pool* B-stanica koje su u selekciji (Shaffer, 2002.). Upravo je ekspresija c-MYC u mnogim B-staničnim limfomima poremećena mehanizmima translokacije, mutacije i amplifikacije, a takav poremećaj može povećati stanični rast i može voditi u transformaciju i daljnju proliferaciju tumorskih stanica. Povećana ekspresija c-MYC obično je povezana s agresivnim limfomima kao što su Burkittov limfom i DLBCL i smatra se kako je povezana s kasnim kliničkim fazama limfoma i smanjenom općom vjerojatnošću preživljavanja (Sanchez-Beato, 2002.). S druge strane, smatra se da je neutralni put tijekom diferencijacije B-stanica onaj koji vodi u apoptozu ili programiranu staničnu smrt, a stanice koje preživljavaju su one koje su pod utjecajem pozitivne selekcije (Janeway, 2012.). Mnogi antiapoptotski proteini, kao što su BCL2, A1, BCLXL, c-FLIP, c-IAP1, c-IAP2 nisko su eksprimirani u većini GCB-stanica. NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) signalni put transkripcijski aktivira nekoliko od ovih gena i donosi jaki anti-apoptotski stimulus stanici (Karin, 2002.). NF- $\kappa$ B dimerni transkripcijski faktori koji pripadaju porodici REL nalaze se u inaktivnom stanju u citoplazmi interakcijom s inhibitorima NF- $\kappa$ B proteina (I $\kappa$ Bs). Signaliziranje kroz mnoge površinske stanične receptore aktivira I $\kappa$ B kinazu (IKK) koja fosforilira I $\kappa$ B čime

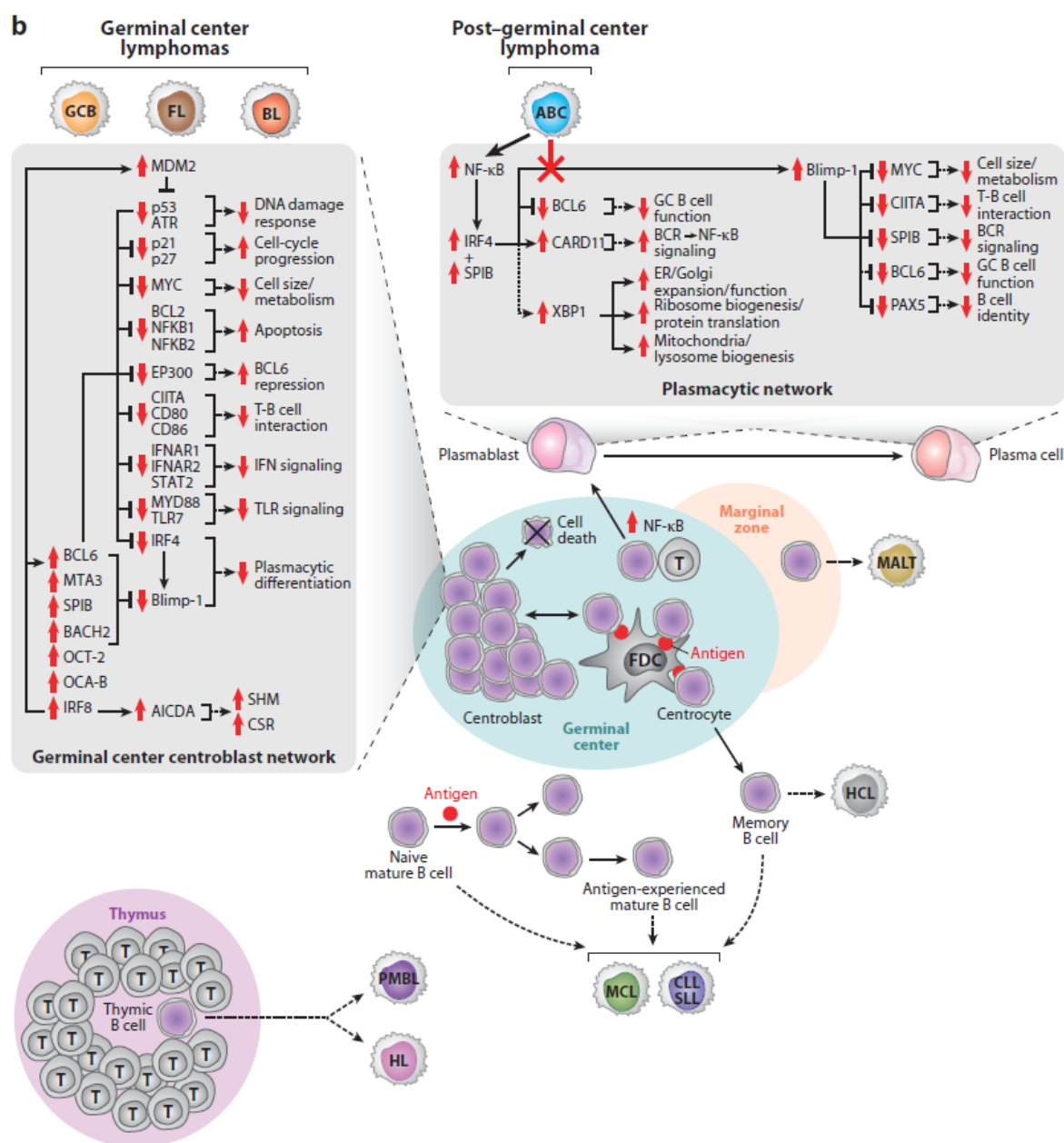
uzrokuje njegovu degradaciju u proteasomima. To vodi do akumulacije NF- $\kappa$ B u jezgri što dalje dovodi po pojačane ekspresije karakterističnog seta NF- $\kappa$ B gena (Sanchez-Beato, 2003.). Niska aktivnost NF- $\kappa$ B signalnog puta u većini GC B-stanica doprinosi neutralnom apoptotskom putu i seriji negativnih selekcija tijekom GC reakcije.

U limfomima podrijetlom iz GC B-stanica postoji nekoliko strategija za zaobilaženje ova opisane sklonosti prema apoptotskom putu, odnosno promoviranje preživljavanja stanice. Većina folikularnih limfoma (~90%) i mnogi DLBCL-i nose translokaciju t(14;18), translokaciju gena *BCL2* i lokusa IgH-a koja dovodi *BCL2* pod kontrolu *IGH E $\mu$*  pojačivača, što vodi do pojačane ekspresije proteina BCL2. Također, lokus BCL2 može biti amplificiran u pojedinim DLBCL-ima, a može biti i transkripcijski prekomjerno eksprimiran u ABC tipu DLBCL-a. Također, u mnogim B-staničnim limfomima dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta na mnogo načina. Neki slučajevi DLBCL imaju translokacije gena *NF $\kappa$ B2* koji kodira podjedinice dimernih NF- $\kappa$ B faktora (Neri, 1995.). U mnogim MALT limfomima često se nalazi translokacija t(11;18) koja vodi prekomjernoj ekspresiji kimeričnog gena *API2/MALT1* koji je pak aktivator NF- $\kappa$ B (Akagi, 1999.). Također, u mnogim limfomima MALT često kao rezultat translokacije t(1;14) dolazi do pojačane ekspresije BCL10, apoptotske regulatorne molekule koja inducira NF- $\kappa$ B aktivaciju.

Uz prije opisane slučajeve u kojima se potiče proliferacija ili onemogućuje stanična smrt, genomske lezije u nekim nekim limfomima dovode do blokiranja daljnje diferencijacije B-stanica. U slučaju GC-B-staničnih limfoma, koji čine većinu B-staničnih limfoma, blokiranje diferencijacije može biti izrazito opasno jer se GCB-stanice dijele izrazito brzo. Zapravo, najčešća genomska abnormalnost koja je opažena u ne-hodkinskim limfomima jest translokacija i/ili mutacija gena *BCL6*, koji kodira transkripcijski regulator B-stanične proliferacije i diferencijacije (Dalla-Favera, 1999.). Gen *BCL6* je meta mnogih translokacija koji uključuju mnoge partnerske kromosome, a nakon translokacije *BCL6* ekspresija može biti poremećena i procesom SHM koji uključuje regulatorne regije na 5'-kraju gena. Pretpostavlja se da ovakve translokacije i mutacije *BCL6* mogu uzrokovati transformaciju stanica tako što produžuju njegovu ekspresiju i nakon stadija B-stadija u kojemu je eksprimiran (Shaffer, 2002.). *BCL6* je transkripcijski represor koji je normalno visoko eksprimiran u GC-B-stanicama i smatra se da je glavni regulator diferencijacije B-stanica, a također je pokazano da *BCL6 knockout* miševi ne mogu formirati germinalne centre i koristiti T-ovisne odgovore na antigen (Allman, 1996., Shaffer, 2012.). *BCL6* aktivnost s poremećenom ekspresijom uslijed translokacije i/ili mutacije opažena je u velikom broju slučajeva DLBCL (50%) i nešto manjem broju folikularnih limfoma (10%) (Shaffer, 2012.). U B-staničnim limfomima

ekspresija ovog gena je najčešće promijenjena zamjenom ili uklanjanjem njegovih regulatornih sekvenci, dok *BCL6* kodirajuće regije uvijek ostaju netaknute. Najčešći način na koji se to događa jest translokacija koja zamjenjuje normalnu 5'regulatornu regiju gena s promotorskim sekvencama više od 20 Ig i ne-Ig gena koji su aktivni u post-GC B-stanicama (Shaffer, 2012.). Važan ciljni gen *BCL6* represora je *PRDM1*, koji pak kodira protein BLIMP1 koji je ključan regulator diferencijacije plazma stanica. Drugi važan cilj ovog represora je *IRF4* koji također inducira BLIMP1 tijekom diferencijacije plazma stanica. Također, *BCL6* omogućuje progresiju u staničnom ciklusu blokirajući ključne inhibitore cili-ovisnih kinaza, CDKN1A i CDKM1B, a također blokira i ekspresiju gena koji su vezani za upalne procese, kao što su kemokini (*IL-10*) i interferonski regulatori (*STAT1*). Također, *BCL6* omogućuje GC stanicama da se nose sa stalnim DNA oštećenjima koji nastaju kao rezultat procesa SHM i CSR tako što blokira gene koji kodiraju važne regulatore u odgovoru na oštećenje DNA (*P21*, *TP53*, *ATR*, itd.). *BCL6* blokira i transkripciju gena koji kodiraju antiapoptotski protein BCL2, kao NFkB1 (Shaffer, 2012.). Zanimljivo je da *BCL6* direktno inhibira c-MYC i BCL2 transkripcijske faktore što znači da je za njihovu transkripciju u transformiranim stanicama potrebna translokacija, odnosno prebacivanje na mjesto gdje isti nisu inhibirani s *BCL6*. Sumarno, *BCL6* je uključen u inhibiciju: gena koji su uključeni u aktivaciju B-stanica (*CD69*, *STAT1*, *CD80*), gena koji su uključeni u negativnu regulaciju staničnog ciklusa, gena koji su uključeni u diferencijaciju plazma stanica (*PRDM1*), gena koji su povezivani s diferencijacijom memorijskih B-stanica i gena koji se pojavljuju kao odgovor na genotoksični stres (*P53*, *ATR*) (Dalla-Favera, 2008.). Rezultat translokacija koje uključuju *BCL6* je to da se njegova ekspresija više ne može utišati jednom kada završi normalni GC odgovor B-stanice što rezultira blokiranjem post-GC diferencijacije (zarobljavanje stanice u GC-fazi razvoja koje je karakteristično za većinu B-staničnih limfoma), a konstitutivna ekspresija *BCL6* također doprinosi održavanju centroblastičnog fenotipa koji je pro-proliferativan i tolerantan na DNA-oštećenja što opet može voditi do dodatnih genetičkih alternacija koje mogu uključivati gene *c-MYC*, *PIMI*, *PAX5*, a koje završno vode u transformaciju, pozitivnu selekciju klonova i limfomagenezu (Dalla-Favera, 2008.). Limfomi s niskim potencijalom dijeljenja (eng. *low growth fraction* BCL) kao što su FL, MZL, MCL, B-CLL imaju niski proliferativni indeks, male stanice, formiraju velike tumorske mase u limfnim čvorovima, koštanoj srži i ektranodalnim lokacijama, pokazuju nisku kliničku agresivnost, a karakteristika su im genetičke promjene koje utječu na BCL2 obitelj proteina, NF-κB signalne puteve, odnosno mijenjaju se apoptotski regulatorni putevi, a regulatorni putevi staničnog ciklusa su manje promijenjeni (ponekad ciklin D1, *ATM*, *PAX5*). Nasuprot njima, limfomi s visokim potencijalom dijeljenja (eng. *high- growth fraction* BCL),

kao što su DLBCL i BL koje karakterizira visoki proliferativni indeks, velike stanice i velika klinička agresivnost karakterizirani su genetičkim promjenama koje uključuju promjene u ekspresiji staničnih regulatora rasta kao što su *BCL6* i *c-MYC*, a kasnije i alternacijama apoptotskih puteva (Sanchez-Beato, 2003.). Gotovo svaka frakcija HGFL (eng. *high-growth fraction lymphoma*) i LGFL (eng. *low-growth fraction lymphoma*) limfoma može tijekom tumorigeneze steći i brojne druge alternacije koje utječu na regulaciju staničnog ciklusa, a obično uključuju abernacije tumor supresorskih putova, najčešće ciklin-ovisnih inhibitora kinaza (CKI) kao što su  $p16^{\text{INK4a}}$ ,  $P27^{\text{KIP1}}$ ,  $P14^{\text{ARF}}$ , te su ovi tumori, bez obzira na njihov histološki razred, izrazito agresivni tumori (Sanchez-Beato, 2003.). Detaljan pregled opisanih mehanizama je na slici 6.



**Slika 6.** Aberantni signalni putovi koji nastaju uslijed grešaka u procesima koji remoduliraju  
Ig gene  
(Preuzeto iz Shaffer, 2012.)

Zanimljivo je da se selekcija za ekspresiju BCR-a događa i u malignim B-stanicama. Dapače, većina B-stanica u B-staničnim limfomima, unatoč nakupljenim mutacijama i translokacijama i dalje ekspresira BCR, iako ponekad puno nižeu odnosu na stanice iz kojih su nastale. Tako je predložena teorija da maligni stanični klon također zahtijeva BCR-ovisne signalne poruke koje bi mu bile nužne za preživljavanje i proliferaciju, odnosno zahtijeva formiranje ispravnog BCR-a da bi preživio, a ova teorija podržana je otkrićem da se gotovo sve translokacije koje uključuju Ig lokus događaju na neuspješno rearanžiranim Ig lokusima, iako bi se teoretski mogli događati podjednaku frekvencijom na oba lokusa (de Jong, 1989.). Neke iznimke kod kojih nije zapažena ekspresija BCR-a su klasični hodkinski limfomi, post-transplantacijski limfomi, primarni efuzijski limfomi i primarni medijastilni B-stanični limfomi (Kuppers, 2005.). Zanimljivo je i opažanje da stanice limfoma mogu prepoznati antigen i da stimulacija uslijed vezanja antigena pridonosi preživljavanju i proliferaciji transformiranih stanica limfoma. Ovaj koncept, koje je tek nedavno dokazan u B-staničnim limfomima, predložen je kao teoretska mogućnost prije oko pedeset godina (Danashek, 1959.). Tako je u nekim slučajevima B-CLL zabilježeno kako BCR osim vezanja antigena pokazuje i specifičnost za strane antigene kao što su virusni proteini (Mann, 1989.). Osim antigena koji potječu od nekog patogena koji uzrokuje kroničnu infekciju, određeni autoantigeni mogu, također, stimulirati proliferaciju reaktivnih malignih B-stanica (Kuppers, 2005.). Osim u slučajevima B-CLL, aktivacija antigenom koja ima ulogu u patogenezi B-staničnih limfoma pokazana je u slučajevima primarnog limfoma centralnog živčanog sustava gdje aktivacija nastupa vezanjem superantigena, mnogim slučajevima folikularnog limfoma i endemičnog Burkittovog limfoma gdje aktivacija nastupa vezanjem autoantigena, B-staničnim limfomima koji vezani za virusom hepatitisa C (HCV) kao što su splenični limfomi marginalne zone (SMZL) te MALT limfomima gdje su gotovo svi slučajevi povezani s kroničnom infekcijom gastrične mukoze bakterijom *Helicobacter pylori* (Kuppers, 2005., Shaffer, 2012.). Koncept uloge antigena u aktivaciji tumorskih B-stanica podržan je činjenicom da se neke autoimune bolesti kao što je reumatoidni artritis i Sjörgenov sindrom povezuju s povećanim rizikom od limfoma (Erhenfeld, 2001.). Moguće je da u nekim slučajevima aktivacija antigenom pruža samo kronični proliferativni stimulus B-stanicama koji se povezuje s rizikom od maligne transformacije.

Također, u mnogim limfomima pokazano je kako tumorski mikrookoliš igra veliku ulogu u preživljavanju i proliferaciji tumorskih stanica. Tako je pokazano kako folikularni limfomi koji zadržavaju ključne karakteristike normalnih GC stanica, također, zadržavaju i ovisnost o BCR ekspresiji i aktivaciji, ali i interakciji s T-stanicama i folikularnim dendritičnim stanicama u folikularnom mikrookolišu gdje se tumor nalazi (Kuppers, 2005., Dalla-Favera, 2008.). S druge strane mnogi gastrični MALT limfomi također ovise o interakciji s T-stanicama koje se infiltriraju u tumorsko tkivo. Tako *in vitro*, *H.pylori* ne stimulira direktno proliferaciju B-stanica već stimulira proliferaciju T-stanica koje se nalaze unutar tumorskog tkiva, a onda te T-stanice aktiviraju tumorske B-stanice (Greiner, 1994.). Također, pokazano je kako interakcija T-stanica i malignih B-CLL stanica u specifičnom mikrookolišu limfnih čvorova i koštane srži pruža bitne signale za preživljavanje i proliferaciju malignih B-CLL stanica (Kuppers, 2005.).

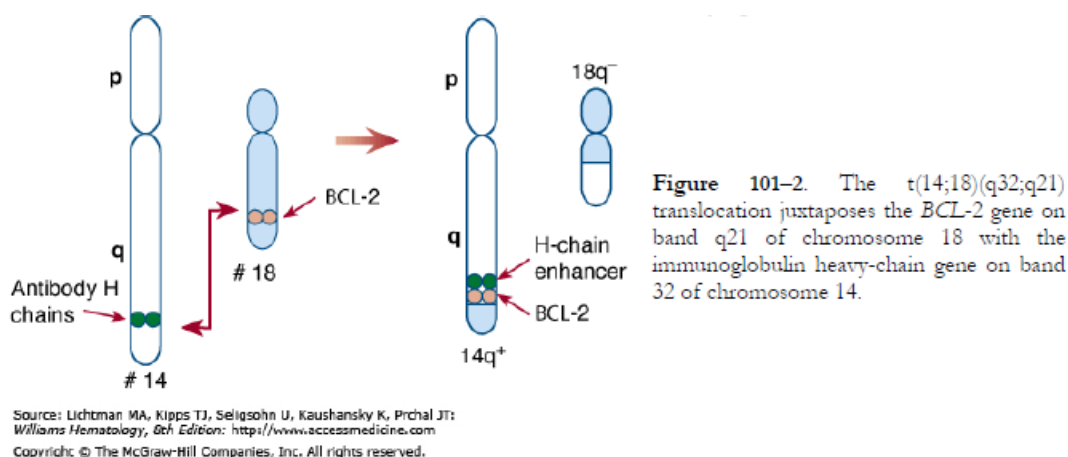
Opisana ovisnost limfoma o ekspresiji BCR-a, aktivacija antigenom kao i mikrookolišni signali preživljavanja doprinose relativnoj sličnosti između mnogih formi B-staničnih limfoma i njihovih stanica iz kojih potječu u smislu fenotipa i profila genske ekspresije. Ovisnost o takvim faktorima određuje tumorski fenotip koji je u mnogim karakteristikama sličan onom opaženom kod normalnih B-stanica. S druge strane, bez tih faktora koje ih fenotipski ograničavaju, stanice limfoma mogle bi steći znatno drugačiji fenotip kroz transformaciju i tumorogenezu kao što se dobro vidi na primjeru klasičnog hodkinskog limfoma koji potječe od normalnih B-stanica, ali čije stanice ne eksprimiraju BCR pa su samim time posljedično u nizu koraka izgubile i mnoge druge karakteristike normalnih B-stanica od kojih su transformacijom nastale (Kuppers, 2005.).

## 4. POJEDINI TIPOVI B-STANIČNIH LIMFOMA

### 4.1. Folikularni limfom (FL)

Folikularni limfom (FL) je neoplazma koju čine stanice folikularnog centra, odnosno GC B-stanice, a tipično sadržava i centrocite i centroblaste te ima potpuno ili djelomično folikularni uzorak (Swerdlow, 2008.). FL je najčešći limfom indolentnog (eng. *low-grade*) tipa te čini oko 20% zabilježenih slučajeva malignih limfoma i najveću učestalost pokazuje u Sjevernoj Americi i zapadnoj Europi. FL se većinom pojavljuje u limfnim čvorovima, ali može zahvaćati i slezenu, koštanu srž, perifernu krv i Waldeyerov prsten. Povremeno se može pojavljivati i na ektranodalnim mjestima koja ne sudjeluju u hematopoezi. Prilikom dijagnosticiranja limfom je najčešće već široko raširen i nalazi se u višim stupnjevima razvoja s perifernom i centralnom limfadenopatijom i splenomegalijom. Samo oko 30% pacijenata prilikom dijagnoze ima FL u prvom i drugom stupnju razvoja. Većina slučajeva FL-a ima dominantno folikularni uzorak s gusto skupljenim folikulima koji prekrivaju normalni nodalni ustroj stanica po čemu je limfom i dobio ime. FL se obično sastoji od 2 tipa B-stanica koje se normalno nalaze u germinalnim centrima; male do srednje velike stanice s produljenim ili rascijepanim jezgrama, teško vidljivim jezgricama i blijedom citoplazmom koje nazivamo centrociti i velike stanice s ovalnim ili višedijelnim jezgrama, vidljivim jezgricama i tamnijom citoplazmom koje nazivamo centroblasti. Centrociti obično dominiraju u folikularnim limfomima, ali centroblasti su uvijek prisutni. Gradiranje FL-a u 3 razreda (1-3) (eng. *grading*) s različitim podstupnjevima temelji se na učestalosti centroblasta u folikularnim neoplazmama koji se detektiraju histološki pri čemu 3. razred ima najveći udio centroblasta (Williams, 2010.). Histološko gradiranje se koristi jer su mnoge studije pokazale su da učestalost centroblasta korelira s agresivnošću tumora pri čemu su stupnjevi 1 i 2 manje agresivni, ali obično neizlječivi, osim u lokaliziranim slučajevima. Maligne stanice FL-a, svih razreda, obično pokazuju ekspresiju monoklonalnih površinskih imunoglobulina, pozitivne su na *BCL2*, *BCL6* i *CD10* i pokazuju ekspresiju površinskih antigena B-stanica kao što su *CD19*, *CD20*, *CD22*, *CD79a*, ali ne pokazuju ekspresiju *CD5*, *CD23*, *CD11c* i *CD43* (Williams, 2010.). Folikularni limfom je podrijetlom od germinalnih B stanica i karakteriziran je kromosmskim translokacijama koje mijenjaju ekspresiju proto-onkogen *BCL2* koji se nalazi na kromoskoj regiji 18q21. Najčešća translokacija koja se pojavljuje u oko 90% slučajeva jest *t(14;18)(q32;q21)* translokacija koja smješta antiapoptotski gen *BCL2* pod gen *IgH* s kromoske regije 14q18. Posljedično, pojačana ekspresija *BCL2* koji je sada pod kontrolom jakog pojačivača gena *IgH*, inhibira normalni apoptotski put GC B-stanice (Bakhsi,

1985.) (Sl. 7.). Puno rjeđe su translokacije t(2;18) i t(18;22) koje obuhvaćaju IgK/ Igλ lokuse i smatraju se biološkim ekvivalentima t(14;18) translokacije.



**Slika 7.** t(14;18)(q32;q21) translokacija karakteristična za folikularni limfom

(Preuzeto iz Williams, 2010.)

Dodatno, kod transformiranih stanica mogu se pronaći i druge citogenetičke abnormalnosti. Tako se kod 90% pacijenata pojavljuju delecije kromosomskih regija 1p, 6q, 10q, 17p kao i insercije 1, 6p, 7, 8, X i 18q/dup regija kromosoma, odnosno njihovih sastavnih dijelova (Williams, 2010.) Poremećaji u 3q27 i/ili genu *BCL6* prisutni su u oko 5-15% slučajeva i obično su povezani s 3. stupnjem razvoja limfoma (Swerdlow, 2008.). Translokacija *BCL2*, iako inicijalni događaj u transformaciji, nije dovoljna da bi se B-stanica transformirala u tumorsku stanicu, a nagomilavanje mnogih, gore navedenih, citogenetičkih promjena povezano je s višim histološkim razvojnim stadijem i većom vjerojatnošću transformacije u agresivni tip limfoma. Translokacija *BCL2* događa se u ranim fazama diferencijacije B-stanice i nastaje kao pogreška u procesu V(D)J rekombinacije koja je katalizirana *RAG1* i *RAG2* rekombinazama. Zanimljivo je da zdrave osobe mogu nositi translokaciju t(14;18) u B-stanicama (Roulland, 2006.). Također, 30 do 40% slučajeva FL-a prolazi transformaciju u mnogo agresivniji tip limfoma (eng. *high-grade*), obično DLBCL, rjeđe u limfom koji nalikuje Burkittovom limfomu. Genetički putovi uključeni u takvu transformaciju obično uključuju inaktivaciju TP53, p16 i aktivaciju MYC transkripcijskog faktora (Swerdlow, 2008.) Klinički, transformacija je karakterizirana naglim rastom jednog limfnog čvora ili jedne mase ekstranodalnog tkiva. Karakteristično je za ovakav sekundarni DLBCL da ima značajno nižu stopu preživljavanja od *de novo* DLBCL-a vjerojatno zbog akumulacije mnogih genetičkih aberacija tijekom vremena.

## 4.2. Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL)

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) je neoplazma velikih limfoidnih B-stanica s veličinom jezgre koja je jednaka ili prelazi normalnu jezgru makrofaga i dvostruko je veća od jezgre normalnog limfocita te limfom ima difuzni uzorak (Swerdlow, 2008.). DLBCL se dijeli na mnoge morfološke podskupine koje se od drugih razlikuju molekularnim i imunofenotipskim pokazateljima i čine zasebne bolesti. S druge strane, postoji i mnogo slučajeva koji su biološki izrazito heterogeni i ne mogu se klasificirati u neku od podskupina pa se nazivaju DLBCL limfomima koji nisu specificirani (NOS, eng. *not otherwise specified*) (Tab. 5.). DLBCL NOS je najčešći tip agresivnih limfoma te najčešći tip malignog limfoma općenito i čini oko 30% do 40% svih zabilježenih slučajeva kod odraslih (Lenz, 2011.). DLBCL NOS obično se pojavljuju kao *de novo* limfomi (primarni DLBCL) ali mogu se pojaviti i kao rezultat progresije ili transformacije iz manje agresivnih tumora kao što su CLL/SLL, FL, MZL ili NLPHL kada ih nazivamo sekundarni DLBCL (Swerdlow, 2008.). DLBCL može se razvijati na ektranodalnim ili nodalnim mjestima u tijelu pri čemu inicijalno ektranodalni limfomi čine oko 40% slučajeva. Limfom se obično sastoji od kombinacije velikih limfoidnih stanica, centroblasta i limfoblasta, koji rastu u difuznu skupinu stanica koja potpuno prekiva normalnu arhitekturu organa. Morfološke varijante limfoma, važne za dijagnostiku i liječenje, razlikujemo po veličini i morfološkim karakteristikama stanica te tako definiramo centroblastičnu varijantu u kojoj dominiraju centroblasti i imunoblastičnu varijantu u kojoj dominiraju imunoblasti (Martelli, 2013.). Nešto rjeđe varijante su anaplastična varijanta koja sadrži velike poligonalne stanice s neobičnim polimorfnim jezgrama koje nalikuju djelomično Reed-Sternberg stanicama i multilobatna varijanta. Alizadeh je 2000. opisao dvije molekularne grupe DLBCL-a na temelju analize genetičke ekspresije tumorskih stanica. Prva grupa, koju nazivamo grupa nalik GCB stanicama pokazuje obrazac genetičke ekspresije sličan B-stanicama germinalnog centra (GC) i taj tip čini 45-50% slučajeva. Drugi tip, kojeg nazivamo aktivnim B-stanicama slični DLBCL, pokazuje obrazac genetičke ekspresije sličan aktiviranim perifernim B-stanicama. Treću grupu, koja je opisana nešto kasnije čine svi oni slučajevi koji ne mogu biti klasificirani u ove dvije grupe (Swerdlow, 2008.). Ove dvije grupe DLBCL-a pokazuju i drugačije kromosomske aberacije povezane s transformacijom stanice. ABCDLBCL grupa obično pokazuje duplikacije 3q, 18q21-q22 i delecije 6q21-q22, dok GCBDLBCL grupa obično pokazuje duplikacije 12q12 te najčešće pokazuje aberacije u položaju genskog lokusa *BCL2* (Bea, 2005.).

**Tablica 5. Klasifikacija DLBCL**

|                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL), NOS</b>                                              |
| Difuzni B-velikostanični limfom , NOS                                                            |
| B-velikostanični limfom bogat T-stanicama/histiocitima                                           |
| EBV-pozitivni DLBCL starijih                                                                     |
| DLBCL s pretežno ektranodalnom lokalizacijom                                                     |
| Primarni B-velikostanični limfom medijastinuma                                                   |
| Intravaskularni B-velikostanični limfom                                                          |
| Primarni kožni DLBCL, nožni tip                                                                  |
| Primarni DLBCL centralnog živčanog sustava                                                       |
| Limfomatoidna granulomatoza                                                                      |
| Limfomi velikih B-stanica završnog stadija diferencijacije                                       |
| ALK-pozitivni B-velikostanični limfom                                                            |
| Plazmablastični limfom                                                                           |
| Primarni efuzijski limfom                                                                        |
| DLBCL povezan s kroničnom upalom                                                                 |
| B-stanični limfomi karakteristika između DLBCL-a i drugih limfoma                                |
| Neklasificirani B-stanični limfomi karakteristika između DLBCL-a i Burkittovog limfoma           |
| Neklasificirani B-stanični limfomi karakteristika između DLBCL-a i klasičnog hodgkinskog limfoma |

Kao stanice iz kojih nastaje DLBCL danas se smatraju periferne B-stanice, odnosno germinalne B-stanice (GCB-grupa) ili aktivirane post-germinalne stanice (ABC-grupa). Neoplastične stanice obično pokazuju ekspresiju B-staničnih markera kao što su CD19, CD20, CD22 i CD79a, ali neki od njih se ne nalaze u svim slučajevima. U pojedinim slučajevima, od kojih neki imaju klinički značaj, nalazi se i ekspresija površinskih ili citoplazmatskih imunoglobulina (IgM, IgG, IgA, 50-75% slučajeva), zatim površinskih receptora CD30 (anaplastična varijanta), CD5 (10%, *de novo* DLBCL), CD10 (30-60%), BCL6 (60-90%) i IRF4/MUM1 (35-65%) te p53 (20-60%). U transformiranim stanicama obično su klonalno rearanžirani te u varijabilnim regijama somatski hipermutirani geni za imunoglobulinski teški i laki lanac (Swerdlow, 2008.) Osim molekularnih grupa, Hans i sur. su DLBCL, NOS podijelili u imunofenotipske grupe DLBCL nalik GCB i DLCL koji nije nalik GCB na temelju kombinacije antitijela za CD10, BCL6 i IRF4/MUM1. Ovo grupiranje se ne poklapa s prije spomenutim molekularnim kloniranjem pa je opisan veći broj IHC algoritama (Choi, 2009). U više od 50% slučajeva ovog limfoma bilježe se somatske hipermutacije koje uključuju mnoge genske lokuse kao što su *PIMI*, *MYC*, *RhoH* i *PAX5*, a koje posljedično pridonose transformacijskom potencijalu (Pasqualucci, 2001.). Oko 30% slučajeva DLBCL-a uključuje aberacije u 3q27 regiji koja uključuje gen *BCL6*, koji je tako najčešća translokacija u DLBCL NOS (Swerdlow, 2008.) Translokacija gena *BCL2*, odnosno t(14;18) translokacija koja je karakteristika folikularnog limfoma, može se naći u oko 20-30% slučajeva. Promjene u genu *MYC* zabilježene su u oko 10% slučajeva i obično su povezane s drugim kompleksnim genetičkim alternacijama kao što su *IGHBCL2* translokacija i

translokacija *BCL6* (Tab. 6.). Drugi, značajno rjeđi tip DLBCL-a je T-stanicama/histiocitima-bogati limfom velikih B-stanica koji čini manje od 10% slučajeva DLBCL-a i podrijetlom je od GC-B stanica, karakteriziran je malim brojem raspršenih, atipičnih B-stanica koje se nalaze u okruženju brojnih T-stanica i jako često histiocita te je izrazito agresivan tumor. Još rjeđi tipovi DLBCL-a su primarni difuzni limfom velikih B-stanica koji zahvaća središnji živčani sustav (CNS) koji čini oko 2-3% svih tumora mozga i porijetlom je od aktiviranih B-stanica, zatim primarni kožni DLBCL čini oko 4% svih primarnih kožnih limfoma i podrijetlom je od perifernih B-stanica koje potječu iz post-germinalnog centra, zatim Epstein-Barr virus (EBV) pozitivni DLBCL starijih koji čini oko 8-10% slučajeva u azijskim zemljama i porijekom je od zrelih B-limfocita koji su transformirani infekcijom s EBV te DLBCL koji se povezuje s kroničnom upalom i podrijetlom je od EBV-transformiranih post-GC B-stanica (Swerdlow, 2008.).

**Tablica 6.** Molekularne grupe DLBCL, NOS-a i onkogenični putovi transformacije

| Genomska aberacija                                              | GCB DLBCL (%) | ABC DLBCL (%) | PMBL (%) |
|-----------------------------------------------------------------|---------------|---------------|----------|
| translokacija gena <i>BCL2</i> :<br>t(14;18)                    | 45            | 0             | 18       |
| Amplifikacija gena <i>BCL2</i> :<br>18q21                       | 10            | 34            | 16       |
| amplifikacija gena <i>REL</i> :<br>2p13                         | 28            | 5             | 19       |
| homozigotna delecija<br>gena <i>CDKN2A</i> : 9p21               | 1             | 20            | 0        |
| dodatna kopija ili<br>amplifikacija gena <i>SPIB</i> :<br>19q13 | 3             | 26            | 3        |
| Trisomija 3                                                     | 1             | 26            | 0        |
| Dodatna kopija ili<br>amplifikacija regije 9p24                 | 0             | 6             | 43       |
| mutacija/delecija gena<br><i>PRDM1</i> (Blimp-1)                | 0             | 24            | /        |
| translokacija gena <i>BCL6</i>                                  | 10            | 24            | 33       |

## 5. ZAKLJUČAK

Istraživanja mehanizama razvoja B-staničnih limfoma doprinjela su ne samo unaprjeđivanju znanja o limfomima ili načinima kako ih liječiti već su značajno doprinjela i razumijevanju normalne fiziologije B stanica. Klasifikacija limfoma u posljednjem desetljeću drastično se promijenila razvojem funkcionalne i strukturne genomike što je dovelo do vrlo kompleksnog klasifikacijskog sustava . Iako su opisani mnogi detalji razvoja limfoma, u cijelom transformacijskom nizu od prvih translokacija do kasnijih kumulativnih promjena u kontroli staničnog rasta i diferencijacije još je mnogo nepoznanica. Tako su stanično podrijetlo pojedinog tipa limfoma, translokacije i imunofenotip tumorskih stanica dobro istraženi, dok je razumijevanje kompleksnih onkogenih signalnih putova, odnosno molekula koje u njima sudjeluju još uvijek nedovoljno. To je osobito važno stoga što je blokiranje sudionika onkogenih putova glavni cilj liječenja limfoma. Napretkom genomike i računalne tehnologije adoći će do kumulacije sve više znanja o mutacijama koje karakteriziraju limfome, a te mutacije će se zatim funkcionalno istraživati ne samo na razini pojedinca, već i na razini populacija. S druge strane, budući da, unatoč kompleksnosti klasifikacijskog sustava, različiti B-stanični limfomi pokazuju mnoge zajedničke karakteristike moguće je razjasniti osnovne mehanizme transformacije normalne stanice u tumorsku stanicu. Kompleksnost klasifikacijskog sustava vjerojatno će se povećavati sve dok iza takve kompleksnosti slijedi i selektivnost u liječenju. Osnovni mehanizmi transformacije ili fiziologije B stanica ipak se ne smiju staviti u drugi plan jer i oni mogu pomoći razvijanju novih, poboljšanih terapijskih postupaka.. U tome dijelu važnu ulogu imaju i signalni put B-staničnog receptora kao i mikrookoliš tumorskih stanica. Konačno, gledano u evolucijskom smislu, prednost koju viši organizmi ostvaruju organiziranjem kompleksnog imunološkog sustava, koji tako prati kompleksnost patogena, ipak je veća od opasnosti koju predstavljaju transformirane stanice tog istog sustava.

## 6. SAŽETAK

Mehanizmi koji kontroliraju normalnu diferencijaciju i aktivaciju B-stanice često su u stanici limfoma kako bi u konačnici transformirana stanica imala neograničen rast i razvoj. B-stanice osobito su podložne malignim transformacijama zato što procesi koji dovode do velike raznolikosti imunoglobulina, koja je potrebna u normalnom imunološkom odgovoru, često vode do kromosomskih translokacija i onkogenih mutacija koje uključuju jake promotore Ig gena i mnoge tumor supresorske gene, kao i onkogene. Takvi događaji često vode do blokiranja diferencijacije, sprječavanja apoptoze i/ili poticanja proliferacije B-stanice koja konačno može biti prvi događaj u transformaciji B-stanice u tumorsku stanicu. Dodatno, mnogi B-stanični limfomi trebaju ekspresiju BCR-a kako bi preživjeli, u nekim limfomima aktivacija stanice preko signalnog puta B-staničnog receptora te u nekima specifični faktori mikrookoliša tumora imaju važnu ulogu u tumorogenezi. Istraživanja na polju strukturne i funkcionalne genomike u zadnjih 10 godina značajno su doprinijela spoznajama o mehanizmima uključenim u patogenezu B-limfoma. Opisani su brojni signalni putovi koji su poremećeni u B-staničnim limfomima i koji vode do konstitutivne aktivacije brojnih drugih putova koji potiču preživljavanje tumorske stanice. Također, ovakav pristup istraživanja doveo je do klasifikacije B-limfoma prema stanicama od kojih su nastali budući da se zna kako su transformirane tumorske stanice u genetičkim i imunofenotipskim karakteristikama nalik nekom od tipova normalnih B-stanica. U godinama koje dolaze, nagli napredak genomike mogao bi dovesti do otkrića još mnogih drugih mehanizama koji su uključeni u transformaciju normalne B-stanice, što bi moglo pomoći u razvoju što uspješnijeg liječenja limfoma.

## 7. SUMMARY

Mechanisms that control normal B-cell differentiation and activation are frequently disrupted in lymphoma cells which in the end leads to their unlimited growth and survival. B cells are particularly prone to malignant transformation because processes that normally create immunoglobulin diversity, which is necessary for normal immunologic response, often can cause chromosomal translocations and oncogenic mutations which include strong promoters of Ig genes, tumor-suppressor genes, and oncogenes. Such aberrations often lead to block in differentiation, prevention of apoptosis and/or promotion of proliferation which can represent first oncogenic hit in B-cell transformation. In addition, most of B-cell lymphoma depend on expression of a BCR for their survival. In some lymphomas antigen activation of lymphoma cells through BCR signalling and specific factors from the microenvironment are equally important in tumorigenesis. Research and development of functional and structural genomics greatly improved understanding of mechanisms involved in B-cell lymphoma pathogenesis. Discovery of many signalling pathways which are aberrant in B cell lymphomas, leading to constitutive activation of many pro-survival pathways are now known. In addition, such research showed that B-cell lymphoma can be classified by their cell of origin because transformed cells often resemble normal stages of B-cell differentiation by immunophenotypic and genetic characteristics. In conclusion, development of field of genomics could lead to better understanding of mechanisms that drive B-cell lymphoma pathogenesis, all for one cause - efficient lymphoma therapies.

## 8. LITERATURA

- Alizadeh Ash A. I sur. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature*, **403**, 503-511
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, i sur., 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**:899-906
- Bea Silvia i sur. 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
- Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC i sur., 2009. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*; **15**:5494–502
- Evans Lina S., Barry W Hancock, 2003. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, **362**, 139-146
- Gaidano Gianluca, Pastore Cristiana, Volpe Gisella, 1995. Molecular pathogenesis of non-hodkin lymphoma: a clinical perspective, *Hematologica*, **80**, 454-472
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G i sur., 2004, Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**(1):275–82.
- Jaffe Elaine S., Nancy Lee Harris, Harald Stein, Peter G. Isaacson, 2008. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, **112**, 4384-4399
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M i sur. 2012. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 8th edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC
- Khushalani Nikhil I., Czuczman Myron S., 2002. Molecular Biology of Non-Hodkin's Lymphoma. U: Malignant Lymphomas Ed. Michael L. Grossbard, American Cancer Society, B.C. Decker Inc., Hamilton, London, pp. 47-66
- Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. 1998. Humann immunoglobulin (IgM+IgD+) peripheral blood B cells expressin the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *Exp. Med.* **188**,1679-1689

- Klein Ulf, Riccardo Dalla-Favera, 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Rev. Immunology*, **8**, 22-33
- Küppers Ralf, 2005. Mechanism of B-cell Lymphoma Pathogenesis. *Nature Rev. Cancer*, **5**, 251-262
- Küppers Ralf, Martin-Leo Hansmann, Klaus Rajewsky, 1999. Cellular Origin of Human B-cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, **341**, 1520-1529
- Küppers Ralf, Riccardo Dalla-Favera, 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B-cell lymphoma. *Oncogene*, **20**, 5580-5594
- Lenz Georg, Nogai Hendrik, Bernd Dorken, 2011. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 1803-1811
- Marshall A. Lichtman, Ernest Beutler, Kenneth Kaushansky i sur. 2010. Williams Hematology, 7th Edition, McGraw-Hill
- Martelli M. i sur., 2013. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol/Hematol*, (Article in Press DOI: 10.1016/j.critrevonc.2012.12.009)
- Nussenzweig Andre, Michel C. Nussenzweig, 2010., Origin of Chromosomal Translocations in Lymphoid Cancer, *Cell*, **141**, 1, 27-38
- Pasqualucci Laura, Peter Neumeister, Tina Goossens, Gouri Nanjangud, R. S. K. Chaganti, Ralf Küppers, Riccardo Dalla-Favera 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas, *Nature* **412**, 341-346
- Roulland S, Navarro JM, Grenot P. i sur., 2006, Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: A novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med* **203**:2425-2431
- Sanchez-Beato Margarita, Abel Sanchez-Aguilera, Migueuel A.Piris, 2003. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*, **101**, 1220-1235
- Shaffer A.L., Rosenwald A. and Staudt M.L., 2002. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature Rev. Immunology*, **2**, 920-932
- Shaffer A.L., Young M.R., Staudt M.L., 2012. Pathogenesis of Human B Cell Lymphomas. *Annu. Rev. Immunol.* **30**:565–610
- Shankland Kate R., Armitage James O., Hanock Barry W., 2012., Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, **380**, 848-857

Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S, Pileri S.A., Stein H., Thiele J , Vardiman J.w. (Eds.), 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC: Lyon, IARC Ubrary