

## Mutasi MYC, BCL2, dan BCL6 pada *Triple-hit Lymphoma*

Amal Hayati  
Supri Irianti Handayani  
Agnes Stephanie  
Departemen Patologi Anatomi  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Indonesia  
Jakarta

### ABSTRAK

*Triple-hit lymphoma* merupakan neoplasma sel B matur yang jarang dijumpai. Limfoma ini memiliki karakteristik utama berupa mutasi pada tiga buah gen sekaligus. Mutasi tersebut berupa translokasi yang terjadi pada gen MYC, BCL2, dan BCL6. Ketiga mutasi tersebut turut menentukan karakteristik klinikopatologik limfoma ini. *Triple-hit lymphoma* dikenal bersifat agresif, cenderung menyebar ke organ ekstranodal, resisten terhadap agen kemo-terapi standar, serta memiliki prognosis yang buruk. Berdasarkan klasifikasi tumor hematopoietik dan jaringan limfoid WHO tahun 2008, limfoma ini digolongkan dalam kelompok “*B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between Diffuse Large B-cell Lymphoma and Burkitt Lymphoma*”. Hal ini menunjukkan karakteristik histopatologik *Triple-hit lymphoma* yang berada dalam sebuah spektrum antara kedua entitas limfoma tersebut. Pemeriksaan imunohistokimia dan sitogenetik berperan dalam deteksi *rearrangement* gen sehingga diagnosis *Triple-hit lymphoma* dapat ditegakkan.

**Kata kunci:** *Triple-hit lymphoma, high grade B-cell lymphoma, B-cell lymphoma unclassifiable, MYC, BCL2, BCL6 gene rearrangement*

### PENDAHULUAN

*Triple-hit lymphoma* (THL) merupakan suatu entitas neoplasma sel B matur dari kelompok limfoma non-Hodgkin. Sesuai dengan penamaannya, limfoma ini memiliki karakteristik khusus berupa tiga buah abnormalitas sitogenetik yang ditemukan bersamaan. Ketiga mutasi tersebut terjadi pada gen MYC, BCL2, dan BCL6. Dahulu THL termasuk dalam “*B-cell lymphoma, unclassifiable, (BCLU) with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and Burkitt Lymphoma*” berdasarkan klasifikasi tumor hematopoietik dan jaringan limfoid WHO tahun 2008. Pada revisi klasifikasi tersebut di tahun 2016, THL bersama dengan *double-hit lymphoma* (DHL) dimasukkan ke dalam kelompok *high grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6*.<sup>1</sup>

Insidens THL diperkirakan sangat rendah, meskipun belum ada laporan yang menyebutkan angka pasti. Perkiraan angka kejadian THL dan DHL adalah sebesar 1-12% dari seluruh kasus DLBCL.<sup>2</sup> Laju insidens DLBCL pada tahun 2011-2012 di Amerika Serikat mencapai 6,9 per 100.000 penduduk, dengan perkiraan kasus baru pada tahun 2016 sebanyak 27.650.<sup>3</sup> *The Mithelman Lymphoma Database* pada tahun 2009 melaporkan sebanyak delapan kasus THL dari keseluruhan 796 limfoma yang memiliki mutasi gen *BCL6*.<sup>4</sup>

Meskipun sangat jarang ditemukan, THL diketahui sangat agresif dan seringkali dihubungkan dengan prognosis yang buruk. *Triple-hit lymphoma* memiliki kecenderungan menyebar ke organ ekstranodal, seperti sumsum tulang, susunan saraf pusat, dan saluran gastrointestinal, dalam waktu yang lebih cepat dan frekuensi yang lebih sering dibandingkan jenis limfoma lainnya.<sup>4-6</sup>

*International Prognostic Index* (IPI) pada pasien THL umumnya tinggi ( $\geq 3$ ) dan termasuk dalam kategori *high-intermediate risk*. Skor tersebut diperoleh berdasarkan karakteristik klinis pasien THL yang seringkali menunjukkan tanda stadium lanjut, mengalami peningkatan laktat dehidrogenase (LDH), memiliki *performance status* yang rendah, serta menunjukkan keterlibatan organ ekstranodal.<sup>2,5</sup>

Median kesintasan pasien THL hanya berkisar antara 0,2-1,5 tahun.<sup>2,5,7,8</sup> Pengobatan dengan kemoterapi standar seperti R-CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab) diketahui tidak efektif pada THL.<sup>2</sup>

Penegakan diagnosis THL secara tepat dan cepat sangat diharapkan, mengingat limfoma ini sangat agresif secara klinis, memiliki prognosis buruk, serta memerlukan terapi yang berbeda dengan kemoterapi standar. Tantangan dalam mendiagnosis THL adalah kesulitan mengenali limfoma ini secara histopatologik karena karakteristik morfologinya yang memiliki kesamaan dengan DLBCL dan limfoma Burkitt. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan imuno-histokimia serta sitogenetik untuk membuktikan adanya ketiga mutasi gen yang menjadi karakteristik utama THL. Penulisan tinjauan pustaka ini bertujuan untuk mempelajari mutasi gen MYC, BCL2, dan BCL6 yang terjadi pada THL serta peran mutasi ketiga gen tersebut dalam patogenesis dan sifat klinikopatologis limfoma ini.

### Struktur dan fungsi gen MYC

Gen MYC terletak di kromosom 8q24. Gen ini merupakan regulator transkripsi yang sangat penting pada berbagai proses fisiologis seperti pengaturan siklus sel, apoptosis, sintesis protein, dan adhesi sel.<sup>9</sup> Gen MYC tersusun atas tiga buah ekson. Ekson 1 mengandung dua promoter dan bersifat *noncoding*, sedangkan ekson 2 dan 3 mengkode protein MYC dengan inisiasi translasi pada nukleotida ke-16 dari ekson 2 (Gambar 1).<sup>10</sup>

Gen MYC mengkode faktor transkripsi yang berperan dalam regulasi berbagai gen target, termasuk gen yang berhubungan dengan pertumbuhan dan proliferasi sel.<sup>11</sup> Gen ini merupakan regulator transkripsi yang sangat penting karena turut berperan dalam pengaturan siklus sel, apoptosis, sintesis protein, dan adhesi sel.<sup>9</sup> Protein MYC merupakan DNA-binding transcription factor yang berfungsi dalam

transduksi sinyal intraselular ke inti sel. Protein sebesar 65kDa ini berupa fosfoprotein nuklear dan termasuk dalam keluarga protein *basic helix-loop-helix leucine zipper* (b/HLH/LZ).<sup>9,12</sup> MYC tersusun dari 439 asam amino dan memiliki sebuah domain *N-terminal activation* (NTD), sebuah domain *C-terminal*, serta *central region* (Gambar 2). Di dalam NTD terdapat *transcription activation domain* (TAD) dan tiga buah segmen yang penting dalam fungsi biologis MYC, yaitu MYC box-I (MBI), MYC box-II (MBII), serta MYC box-III (MBIII).<sup>9</sup> MBI memiliki fungsi penting dalam menjaga stabilitas protein, sedangkan MBII diperlukan untuk aktivasi dan represi transkripsi.<sup>13</sup> Domain *C-terminal* penting sebagai tempat berikatannya protein *b-HLH/LZ-interacting*, seperti Myc-associated factor X (Max).<sup>9</sup>

MYC diketahui mengatur ekspresi sekitar 15% dari seluruh gen manusia. Protein ini berfungsi sebagai *master regulatory factor* dari proliferasi, metabolisme, diferensiasi, dan apoptosis sel.<sup>9</sup> MYC, sebagai faktor transkripsi, memengaruhi berbagai gen target dengan cara memicu maupun menghambat aktivasi gen-gen tersebut (Tabel 1). Untuk dapat melakukan transaktivasi ekspresi gen, MYC memerlukan proses dimerisasi dengan protein HLHzip pasangannya yaitu Max.<sup>14</sup> Heterodimer MYC-Max kemudian berikatan dengan sekuen DNA target yang disebut E-Box.<sup>10</sup> Sebaliknya, penekanan ekspresi gen dapat terjadi apabila heterodimer ini berikatan dengan faktor transkripsi Miz1.<sup>14</sup>

MYC berfungsi mendorong proliferasi dan menghambat diferensiasi sel. MYC terlibat dalam fase transisi G0 menuju G1 pada regulasi siklus sel. Pada fase ini, MYC berperan dalam aktivasi dan represi siklin D1 dan D2, siklin E, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), serta siklin B1.<sup>9</sup> MYC memicu ekspresi siklin D1 dan D2 yang kemudian membentuk cyclin D-cyclin dependent kinase (CDK) complexes. Aktivasi kompleks siklin-CDK menyebabkan pemisahan inhibitor siklus sel, seperti p27 dan p21, dari kompleks tersebut. Hal ini menyebabkan siklus sel dapat kembali berjalan karena telah terbebas dari inhibisi.<sup>9,12</sup> Selain itu MYC juga dapat mendorong proliferasi sel dengan cara menekan CDK inhibitor seperti p15 dan p21 melalui interaksi heterodimer MYC-Max dengan faktor transkripsi Miz1.<sup>9</sup>

Tabel 1. Gen target MYC yang terlibat dalam aktivitas metabolismik *transformed cells*.<sup>14</sup>

| Gen target   | Regulasi                      | Jalur  |
|--|-------------------------------|--|
| Cyclin A2,<br>Cyclin D2,<br>Cyclin E1                            | Meningkat                     | Growth factor response                           |
| Enolase, LDH-A<br>Serine hydroxymethyl transferase               | Meningkat<br>Meningkat        | Glikolisis<br>Metabolisme C1                     |
| EIF4E,<br>Ribosomal proteins L3, L6, s15A                        | Meningkat                     | Inisiasi translasi                               |
| Ornithine decarboxylase,<br>Prothymosin-a,<br>HMG1/Y             | Meningkat                     | Transformasi                                     |
| Iron-regulatory protein-2<br>H-ferritin,<br>Transferrin receptor | Meningkat                     | Metabolisme besi                                 |
| Nucleolin,<br>NM23,<br>Nucleophosmin<br>p21CIP1                  | Meningkat                     | Proliferasi sel                                  |
| p15INK4B<br>N-cadherin,<br>Integrin                              | Menurun<br>Menurun<br>Menurun | Respon kerusakan DNA<br>Jalur TGFB<br>Adhesi sel |

Peningkatan proliferasi sel yang disebabkan oleh MYC diimbangi dengan kemampuan MYC memicu apoptosis melalui beberapa jalur.<sup>14</sup> MYC memicu ekspresi suatu *tumor suppression protein* yang disebut ARF. P19Arf yang berikatan dengan Mdm2 akan mengaktifkan p53 dan menyebabkan apoptosis melalui aktivasi gen proapoptosis serta mediator siklus sel. Apoptosis yang dipicu oleh MYC juga dapat terjadi akibat penghambatan ekspresi protein anti-apoptotik seperti BCL2.<sup>9</sup> Selain mengendalikan proliferasi sel, MYC juga turut berperan dalam metabolisme sel. MYC diketahui dapat menstimulasi proses glikolisis dengan cara meningkatkan ekspresi gen *lactate dehydrogenase A* (LDHA), *glucose transporter GLUT1*, hexokinase 2 (HK2), phosphofructokinase (PFKM), and enolase 1 (ENO1).<sup>14</sup> Peningkatan glikolisis ini berguna dalam akumulasi *cell mass* selama fase G1.<sup>10</sup>

### Deregulasi MYC dan pengaruhnya pada keganasan

Sekitar 20% keganasan pada manusia berhubungan dengan ekspresi berlebihan gen MYC. Deregulasi gen ini ditemukan karsinoma payudara, karsinoma kolon, karsinoma serviks, leukemia myeloid, melanoma, osteosarkoma, glioblastoma, dan karsinoma paru sel kecil.<sup>9</sup>

Ekspresi dan fungsi MYC dikendalikan secara ketat oleh sinyal mitogen pada sel normal. Transkripsi gen ini diketahui akan berkurang tanpa adanya sinyal regulator positif. Sifat onkogenik yang dimiliki MYC ini dikendali-

kan melalui beberapa mekanisme. Pertama, mRNA dari MYC berumur sangat pendek dan waktu paruh protein ini juga rendah, hanya sekitar 30 menit. MYC kemudian akan mengalami *ubiquitylation* dan didegradasi oleh proteasom. Mekanisme pengendalian lainnya adalah kemampuan MYC memicu apoptosis pada keadaan *overexpression*.<sup>14</sup>

Fungsi MYC pada sel tumor hampir selalu meningkat akibat mutasi pada gen MYC sendiri maupun akibat induksi ekspresi gen MYC oleh jalur onkogenik di atasnya. Ekspresi MYC yang abera ini berhubungan dengan pertumbuhan dan pembelahan sel yang tidak terkontrol. *Overexpression* protein MYC menyebabkan peningkatan proliferasi sel, penurunan diferensiiasi sel, serta peningkatan kecepatan siklus sel.<sup>15</sup> Selain pengaruhnya terhadap proliferasi, kontrol MYC terhadap glikolisis mengakibatkan terjadinya *warburg effect*. Ekspresi LDHA yang dipicu MYC menyebabkan peningkatan asam laktat sebagai hasil konversi dari piruvat pada jalur glikolisis, meskipun dalam suasana aerob. Perubahan metabolisme ini terjadi pada sel yang bertransformasi ganas. Tujuan perubahan metabolisme ini adalah untuk memenuhi kebutuhan protein, lipid, dan asam nukleat yang meningkat pada sel yang mengalami pembelahan cepat.<sup>14</sup>

### Translokasi gen MYC pada limfoma

Translokasi MYC merupakan karakteristik dari limfoma Burkitt, tetapi dapat pula ditemukan pada *chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma* (CLL/SLL), DLBCL, limfoma sel mantle, dan limfoma folikular. Sebanyak 80-85% translokasi MYC melibatkan gen IGH di kromosom 14q32. Varian lain translokasi ini melibatkan gen IGK dan IGL yang masing-masing berada pada kromosom 2p11 dan 22q11. Translokasi jenis ini hanya ditemukan pada 10-15% tumor.<sup>12</sup>

Pada translokasi kromosom 8 dengan kromosom 14, MYC berpindah ke 5' dari lokus IGH pada kromosom 14 (Gambar 3). Hal ini berbeda dengan dua jenis translokasi lainnya, yaitu t(2;8) atau t(8;22). Kedua translokasi ini menyebabkan lokus IGK atau IGL berjukstaposisi 3' dengan gen MYC di kromosom 8.

Lokasi *breakpoint* baik pada kromosom 8 maupun 14 bervariasi, bergantung pada jenis tumor. Contohnya pada limfoma Burkitt endemik, *breakpoint* kromosom 8 berada lebih jauh dari 100 kb 5'dari gen *myc* dan *breakpoint* kromosom 14 terletak di dalam regio J gen IGH.

Berbeda dengan limfoma Burkitt endemik, pada limfoma Burkitt sporadik *breakpoint* kromosom 8 terdapat tepat di 5' atau di dalam gen MYC dan *breakpoint* kromosom 14 terletak di dalam *switch* (S) atau regio C.<sup>12</sup> Jukstaposisi MYC dengan elemen *enhancer* gen IGH diketahui memengaruhi transkripsi MYC sehingga menyebabkan ekspresi berlebihan protein yang dikode oleh gen tersebut.<sup>11</sup>

### Struktur dan fungsi gen *BCL2*

Gen BCL2 berada di kromosom 18q21.3.<sup>16</sup> Gen ini berfungsi mengkode suatu protein berukuran 25 kDa yang menempati membran luar mitokondria, membran retikulum endoplasma, dan sitosol.<sup>17</sup> BCL2 termasuk dalam BCL2 *family protein* yang bersifat anti-apoptotik. Protein ini memiliki empat domain BCL2 *homology* (BH1-4) (Gambar 4). Pada perbatasan dengan C-terminus, terdapat sekuen hidrofobik sepanjang 16-19 residu yang membentuk *hydrophobic transmembrane domain* (TM). TM berfungsi membantu *targeting* ke membran intraselular dan akan tertanam pada membran luar mitokondria.<sup>18,19</sup> BCL2 membentuk *helical bundle fold* khas yang membuatnya mampu berikatan dengan BCL2 *family protein* lainnya yang bersifat pro-apoptotik, sehingga fungsi anti-apoptotiknya dapat berjalan.<sup>20</sup>

BCL2 berfungsi mencegah kebocoran sitokrom c dan protein pro-apoptotik lainnya dari mitokondria ke sitoplasma dengan cara menjaga impermeabilitas membran luar mitokondria (Gambar 5).<sup>17</sup> BCL2 mempertahankan integritas membran mitokondria dengan cara melawan kerja protein pro-apoptotik (Bak dan Bax) yang mampu memicu *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP).<sup>19</sup> Hal ini menyebabkan jalur intrinsik apoptosis tidak dapat berjalan.

### Translokasi gen *BCL2* dan pengaruhnya pada limfogenesis

Gen BCL2 dapat mengalami translokasi ke tiga kromosom berbeda yaitu *immunoglobulin* (IG) *heavy chain* (IGH) di 14q32 atau IG *light chain* (IGK, IGL) yang masing-masing terletak di 2p11 dan 22q11. Translokasi ke kromosom 14 (IGH) adalah yang paling sering ditemukan. Translokasi ini terjadi pada sebagian besar kasus limfoma folikular (70-95%) dan 20-30% kasus DLBCL.<sup>16</sup> Pada t(14;18) gen BCL2 yang strukturnya intak akan menempati posisi tepat berdampingan (jukstaposisi) dengan gen IGH di kromosom 14 (Gambar 6).<sup>12</sup> Perpindahan ini menyebabkan gen BCL2 berada di bawah

kendali *enhancer* gen IgH, sehingga terjadi disregulasi ekspresi BCL2.<sup>19</sup>

*Breakpoint* gen BCL2 dapat terletak pada 3 titik, yaitu *major breakpoint region* (MBR), *minor cluster region* (mcr), atau *intermediate cluster region* (Gambar 7). MBR merupakan *breakpoint* yang paling sering ditemukan dari ketiga *breakpoint* tersebut. Berbeda dengan *breakpoint* gen BCL2 yang tersebar, *breakpoint* pada kromosom 14 hanya terkonsentrasi di 5'regio J gen IGH.<sup>12</sup>

### Translokasi kromosom

t (14;18) menyebabkan peningkatan ekspresi protein BCL2.<sup>12</sup> Limfosit B neoplastik dengan peningkatan ekspresi BCL2 akan menjadi resisten terhadap apoptosis dan mampu berproliferasi di sentrum germinativum.<sup>16</sup> Penghindaran apoptosis ini merupakan salah satu *hallmarks of cancer* yang penting dalam tumorigenesis. BCL2 *overexpression* diketahui dapat mengakselerasi perkembangan limfoma pada mencit *Eμ- Myc lymphoma model*, selain itu kemampuan anti-apoptotik BCL2 juga berpengaruh pada resistensi sel tumor terhadap kemoterapi.<sup>19,20</sup>

### Struktur dan fungsi gen *BCL6*

Gen *B-cell lymphoma 6* (BCL6) terletak pada lokus kromosom 3q27. Gen sepanjang 26kb ini memiliki 10 ekson dan mengkode protein BCL6 yang terdiri atas 706 asam amino (Gambar 8).<sup>12</sup> Protein ini termasuk dalam keluarga faktor transkripsi BTB/POZ/Zinc Finger dan berperan sebagai represor transkripsi. BCL6 memiliki kemampuan menghambat berbagai jalur *signaling*, seperti DNA damage response, apoptosis, diferensiasi sel plasma, B-cell receptor (BCR) signaling, CD40 signaling, TNFβ signaling, Interferon (INF) signaling, Toll-like receptor (TLR) signaling, WNT signaling, dan T-cell mediated activation.<sup>22</sup>

BCL6 diperlukan dalam pembentukan sentrum germinativum normal. BCL6 berperan dalam diferensiasi sel B dalam sentrum germinativum, antibody-affinity maturation, dan T-helper cell mediated response.<sup>12</sup> BCL6 secara khusus hanya terekspresi pada fase diferensiasi sentrum germinativum. Sentrum germinativum merupakan sebuah struktur transien yang terbentuk di dalam organ limfoid sekunder saat menghadapi stimulus antigen. Saat memasuki reaksi sentrum germinativum, sel B berubah menjadi sentroblas yang memiliki kemampuan proliferasi yang tinggi serta mengalami immunoglobulin somatic hypermutation (SHM).

Proses ini berguna untuk menghasilkan sel B yang memiliki afinitas tinggi terhadap suatu antigen. BCL6 berperan melemahkan sensor kerusakan DNA pada sentroblas, seperti ATR, CHEK1, TP53, dan CDKN1A, sehingga modifikasi DNA pada SHM dapat terjadi tanpa memicu respon sel terhadap kerusakan DNA.<sup>22,24</sup>

Peran BCL6 dalam inhibisi diferensiasi sel plasma menyebabkan protein ini jarang diekspresikan di *post-germinal center* (GC).<sup>22</sup> *Downregulation* BCL6 di *post-GC* diperlukan agar sel B (sentrosit) dapat berdiferensiasi menjadi sel plasma atau sel memori. Proses *downregulation* ini melibatkan CD40 dan STAT5 sebagai mediator. Stimulasi oleh CD40 menginduksi ekspresi IRF4, suatu faktor transkripsi mampu menghambat ekspresi BCL6. IRF4 menghambat BCL6 dengan cara berikatan dengan elemen DNA pada ekson 1 dan intron 1 dalam lokus genomik BCL6.<sup>24</sup> Inhibisi BCL6 di *post-GC* mengembalikan respon sel terhadap kerusakan DNA, menghambat proliferasi, serta menyebabkan regulator diferensiasi sel plasma, yaitu *B lymphocyte-induced maturation protein* 1 (BLIMP), dapat terekspresi sehingga diferensiasi sel plasma dapat terjadi.<sup>12</sup>

### Translokasi gen BCL6

Mutasi gen BCL6 ditemukan pada 30-40% kasus DLBCL *de novo* dan sekitar 10% limfoma folikular. Mutasi yang terjadi dapat berupa translokasi yang menggabungkan sekuen *coding* BCL6 dengan promoter gen lain ataupun mutasi titik pada BCL6 *promoter negative regulatory elements*.<sup>24</sup> Gen BCL6 diketahui dapat bertranslokasi dengan sejumlah *partner chromosome loci*. Sebanyak 40-50% translokasi BCL6 terjadi dengan gen IGH pada kromosom 14q32.<sup>12</sup> Lokus kromosom lain yang diketahui dapat bertranslokasi dengan BCL6 antara lain gen IGL (22q11), IKZF1 (7p12), *histone H4* (6p21), IL21R (16p11), dan LCP1 (13q14) (Gambar 9).<sup>25</sup>

*Breakpoint* gen BCL6 terpusat di 3q27 regio 4-kb yang meliputi promoter dan ekson *noncoding* pertama. Pada sebagian besar kasus, *breakpoint* terletak tepat di 3' dari ekson pertama. Hal ini menyebabkan ekson 2 sampai 10 langsung berdampingan dengan gen *partner*.<sup>12</sup> Translokasi ini mengakibatkan ekspresi berlebihan protein BCL6 yang normal secara kualitatif. Alel BCL6 yang mengalami translokasi kromosom ataupun mutasi titik akan kehilangan tempat ikatan dengan IRF4 sehingga

efek represor IRF4 terhadap ekspresi BCL6 melemah. Hal ini menyebabkan ekspresi konstitutif BCL6 yang mendasari limfomagenesis.<sup>24</sup>

### Deteksi rearrangement gen MYC, BCL2, dan BCL6

*Rearrangement* gen dapat dideteksi dengan analisis sitogenetik konvensional (karyotyping) maupun *fluorescence in situ hybridization* (FISH). Meskipun *karyotyping* dianggap sebagai baku emas pemeriksaan abnormalitas sitogenetik, pemeriksaan ini cukup sulit untuk dijadikan sebagai prosedur rutin. *Karyotyping* memerlukan jaringan dengan volume yang cukup besar serta dalam keadaan segar. Keahlian melakukan kultur sel juga dibutuhkan agar dapat memperoleh sel metafase yang berkualitas baik. FISH diketahui dapat menggantikan *karyotyping* dalam beberapa kasus. Pemeriksaan ini lebih cepat dan relatif lebih murah. Teknik pemeriksaan FISH juga lebih mudah serta dapat menggunakan jaringan *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE). FISH memiliki keunggulan resolusi dibandingkan dengan *karyotyping*. Hal ini menyebabkan kemampuan deteksi FISH terhadap translokasi spesifik lebih baik, namun di sisi lain *genome-wide perspective* menjadi tidak dapat terlihat (Gambar 10).<sup>27</sup>

Keberadaan protein MYC, BCL2, dan BCL6 sebagai hasil dari translokasi gen pengkodenya dapat dideteksi dengan pemeriksaan imunohistokimia (IHK) (Gambar 11). Protein MYC diekspresikan pada inti sel dengan *cut off* positivitas sebesar 40%.<sup>15</sup> BCL6 juga dieskpresikan pada inti sel, tetapi *cut off* positivitas protein ini masih sangat bervariasi antar-studi yaitu 10-60%.<sup>29</sup> Berbeda dengan kedua protein tersebut, BCL2 dapat dideteksi pada membran sel dan sitoplasma. Belum ada kesepakatan mengenai *cut off* positivitas protein ini, tetapi diperkirakan berkisar antara 50-70%. Yan dkk<sup>30</sup> mengemukakan nilai *cut off* optimal ekspresi protein MYC, BCL2, dan BCL6 yang berhubungan dengan translokasi gen pengkodenya, yaitu masing-masing sebesar ≥90%, ≥70%, dan ≥20%.

### Karakteristik histopatologik dan imunofenotip THL

Gambaran histopatologik pada THL umumnya beragam. Sesuai klasifikasinya sebagai BCLU, karakteristik morfologi THL berada dalam sebuah spektrum antara DLBCL dan limfoma

Burkitt. Beberapa kasus THL pada salah satu ujung spektrum menunjukkan kemiripan morfologi dengan limfoma Burkitt karena sel-selnya berukuran lebih kecil daripada DLBCL tipikal. Hal ini berbeda dengan morfologi pada ujung lain spektrum yang lebih menyerupai DLBCL karena memiliki ukuran sel yang lebih besar dibandingkan dengan limfoma Burkitt tipikal. *B-cell lymphoma unclassifiable* sering menunjukkan gambaran mirip limfoma Burkitt dengan makrofag *starry-sky*, mitosis yang banyak, apoptosis prominent, dan indeks proliferasi yang tinggi. Perbedaan BCLU dengan limfoma Burkitt tipikal terletak pada morfologi sel tumor. Ukuran dan kontur inti sel tumor pada BCLU lebih bervariasi. Sel tumor memiliki kontur inti yang irreguler dengan anak inti yang relatif lebih besar. Hal ini menunjukkan bahwa morfologi sel BCLU berada di antara limfoma Burkitt dan DLBCL (Tabel 2).<sup>31</sup>

Tabel 2. Perbedaan karakteristik morfologi, imunofenotip, dan genetik BCLU dengan limfoma Burkitt dan DLBCL.<sup>31</sup>

| Karakteristik                | Limfoma Burkitt | BCLU   | DLBCL  |
|------------------------------|-----------------|--------|--------|
| Morfologi                    |                 |        |        |
| Hanya sel kecil/sedang       | Ya              | Sering | Tidak  |
| Hanya sel besar              | Tidak           | Tidak  | Sering |
| Campuran                     | Tidak           | Kadang | Jarang |
| Proliferasi (Ki67/MIB1)      |                 |        |        |
| >90% dan homogen             | Ya              | Sering | Jarang |
| <90% atau heterogen          | Tidak           | Kadang | Sering |
| Ekspresi BCL2                |                 |        |        |
| Negatif / lemah              | Ya              | Kadang | Kadang |
| Kuat                         | Tidak           | Kadang | Kadang |
| Genetik                      |                 |        |        |
| Rearrangement MYC            | Ya              | Sering | Jarang |
| IG-MYC                       | Ya              | Kadang | Jarang |
| Non IG-MYC                   | Tidak           | Kadang | Jarang |
| BCL2 tanpa rearrangement MYC | Tidak           | Jarang | Kadang |
| BCL6 tanpa rearrangement MYC | Tidak           | Jarang | Kadang |
| Double hit                   | Tidak           | Kadang | Jarang |

Kesamaan morfologi THL dengan limfoma Burkitt ditunjukkan dengan gambaran *starry-sky* yang dibentuk oleh *tingible body macrophages* dan sel tumor yang berukuran sedang. Morfologi sel THL pada kasus yang jarang dapat menunjukkan inti sel yang relatif kecil dengan kromatin granular halus, sehingga tampak serupa dengan limfoma limfoblastik. Diagnosis limfoma limfoblastik dapat dieksklusi pada kasus ini karena sel-sel yang tampak blastoid ini tidak memiliki penanda TdT (Gambar 12).<sup>1,31</sup>

THL secara umum mengekspresikan penanda sel B seperti CD19, CD20, CD22, dan CD79a.<sup>31</sup> THL juga menunjukkan positivitas terhadap BCL2, BCL6, dan MYC sesuai dengan

abnormalitas sitogenetiknya.<sup>28</sup> Positivitas terhadap CD10 juga umum ditemukan pada THL, sehingga limfoma ini umumnya termasuk dalam subtipen *germinal center B-cell like* (GCB) berdasarkan klasifikasi Hans.<sup>5,28</sup> Agresivitas THL ditunjukkan dengan indeks proliferasi Ki67 yang umumnya tinggi, dengan kisaran 50-100% (Gambar 13).<sup>31</sup> Oleh karena keragaman karakteristik histopatologik dan imunofenotip pada kasus-kasus THL, penegakan diagnosis memerlukan bukti *rearrangement* gen MYC, BCL2, dan BCL6 secara bersamaan.

### **Double-hit lymphoma, Double expressor lymphoma (DEL), limfoma Burkitt, dan DLBCL sebagai diagnosis banding THL**

#### **Double-hit lymphoma**

Entitas limfoma ini juga termasuk dalam kelompok HGBL with *rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6* (Tabel 3). DHL memiliki karakteristik klinis dan morfologis serupa dengan THL. Perbedaan yang mendasari pemisahan kedua limfoma ini adalah jenis abnormalitas sitogenetik yang terjadi. Terdapat *rearrangement* dua buah gen sekaligus pada DHL, yaitu *MYC* dan *BCL2* (BCL2-DHL) atau *MYC* dan *BCL6* (BCL6-DHL).

Angka kejadian DHL sangat rendah, meskipun besaran angka tersebut bervariasi pada berbagai literatur. DHL diketahui mencakup 1-12% dari seluruh kasus DLBCL.<sup>2</sup> BCL2-DHL merupakan bentuk DHL yang paling sering ditemukan. Bentuk limfoma ini memiliki prognosis yang lebih baik dibandingkan dengan BCL6-DHL.<sup>7</sup>

#### **Double expressor lymphoma**

*Double expressor lymphoma* merupakan bentuk limfoma yang juga menunjukkan *overexpression* protein MYC dan BCL2. Limfoma ini merupakan bagian dari DLBCL. Ekspresi protein MYC yang dihubungkan dengan ekspresi BCL2 diketahui terjadi secara bersamaan pada 20-35% kasus DLBCL, akan tetapi sebagian besar tumor ini tidak mengandung mutasi gen *MYC* maupun *BCL2*.<sup>1</sup> *Overexpression* protein yang tanpa disertai mutasi gen pengkodeinya inilah yang menjadi karakteristik utama DEL.<sup>32</sup>

Tabel 3. Klasifikasi neoplasma limfoid matur WHO 2016.<sup>1</sup>

| Mature B-cell neoplasms  |
|--|
| Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma  |
| Monoclonal B-cell lymphocytosis*   |
| B-cell prolymphocytic leukemia   |
| Splenic marginal zone lymphoma   |
| Hairy cell leukemia  |
| <i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>  |
| <i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>  |
| <i>Hairy cell leukemia-variant</i>   |
| Lymphoplasmacytic lymphoma   |
| Waldenström macroglobulinemia  |
| Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*  |
| μ heavy-chain disease  |
| γ heavy-chain disease  |
| α heavy-chain disease  |
| Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*  |
| Plasma cell myeloma  |
| Solitary plasmacytoma of bone  |
| Extraskeletal plasmacytoma   |
| Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*   |
| Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)                   |
| Nodal marginal zone lymphoma   |
| <i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>  |
| Follicular lymphoma  |
| <i>In situ follicular neoplasia*</i>   |
| Duodenal-type follicular lymphoma*   |
| Pediatric-type follicular lymphoma*  |
| <i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement</i>   |
| Primary cutaneous follicle center lymphoma   |
| Mantle cell lymphoma   |
| <i>In situ mantle cell neoplasia*</i>  |
| Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS   |
| Germinal center B-cell type*   |
| Activated B-cell type*   |
| T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma   |
| Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)  |
| Primary cutaneous DLBCL, leg type  |
| EBV+ DLBCL, NOS*   |
| EBV+ mucocutaneous ulcer*  |
| DLBCL associated with chronic inflammation   |
| Lymphomatoid granulomatosis  |
| Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma   |
| Intravascular large B-cell lymphoma  |
| ALK+ large B-cell lymphoma   |
| Plasmablastic lymphoma   |
| Primary effusion lymphoma  |
| HHV8+ DLBCL, NOS*  |
| Burkitt lymphoma   |
| <i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>  |
| High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*                                |
| High-grade B-cell lymphoma, NOS*   |
| B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma |

Diagnosis limfoma ini didasarkan pada pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan *cut off* 40% untuk sel yang mengekspresikan MYC dan lebih dari 50% untuk ekspresi BCL2.<sup>1</sup> Manifestasi klinis DEL lebih berat dibandingkan dengan DLBCL tanpa *overexpression* MYC dan BCL2. Pasien dengan DEL umumnya memiliki *performance status* yang lebih buruk, melibatkan organ ekstranodal multipel, skor IPI dan indeks proliferasi yang lebih tinggi, serta lebih banyak kasus yang mencapai stadium III/IV. Sebagian besar kasus DEL memiliki fenotip *activated B-cell* (ABC). Hal

ini berbeda dengan DHL yang sebagian besar kasusnya memiliki fenotip GCB.<sup>32</sup> Beberapa studi menyimpulkan bahwa DEL memiliki prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan DLBCL *not otherwise specified* (DLBCL,NOS), namun tidak seagresif HGBL.<sup>1</sup> Bentuk limfoma ini juga menunjukkan hasil yang buruk setelah kemoterapi R-CHOP, dengan kesintasan jangka panjang kurang dari 30%.<sup>33</sup> Meskipun memiliki karakteristik klinis dan imunofenotip khusus, DEL bukan merupakan sebuah kategori atau subtip baru dari DLBCL pada klasifikasi WHO 2016. Ekspresi ganda MYC dan BCL2 tanpa mutasi kedua gen tersebut hanya dianggap sebagai indikator prognostik DLBCL.<sup>1</sup>

### Limfoma Burkitt

Limfoma Burkitt merupakan jenis limfoma sel B matur yang memiliki *doubling time* sangat pendek. Limfoma ini sering ditemukan pada organ ekstranodal atau sebagai leukemia akut. Translokasi yang melibatkan MYC merupakan karakteristik utama limfoma ini, meskipun abnormalitas sitogenetik tersebut tidak bersifat spesifik untuk limfoma Burkitt.

Limfoma ini dibagi ke dalam tiga varian klinis berdasarkan gejala klinis, morfologi, dan biologi. Ketiga varian klinis tersebut yaitu limfoma Burkitt endemik, limfoma Burkitt sporadik, dan *immunodeficiency-associated Burkitt lymphoma*. Limfoma Burkitt endemik umumnya ditemukan di daerah Khatulistiwa Afrika, Papua, dan Papua Nugini. Limfoma ini sering terjadi pada anak dengan puncak usia 4-7 tahun dan perbandingan pria:wanita 2:1. Serupa dengan limfoma Burkitt endemik, limfoma Burkitt sporadik juga banyak ditemukan pada anak dan dewasa muda dengan predominansi laki-laki. *Immunodeficiency-associated Burkitt lymphoma* dihubungkan dengan infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV).

Limfoma Burkitt sering dijumpai pada organ ekstranodal dengan predileksi khusus sesuai varian klinisnya. Keterlibatan susunan saraf pusat dapat ditemukan pada ketiga varian limfoma Burkitt. Sekitar 50% kasus limfoma Burkitt endemik ditemukan pada rahang dan tulang wajah lainnya, termasuk orbita. Tumor rahang sangat jarang ditemukan pada limfoma Burkitt sporadik. Sebagian besar kasus limfoma Burkitt sporadik muncul dengan keluhan massa abdomen dan organ yang paling sering terlibat adalah regio ileosekal. Serupa dengan limfoma Burkitt endemik, limfoma Burkitt sporadik juga

dapat ditemukan pada ovarium, ginjal, dan payudara. Tumor pada kelenjar getah bening lebih sering dijumpai pada pasien dewasa dibandingkan dengan anak. Pada *immunodeficiency-associated Burkitt lymphoma*, lokalisasi tumor pada kelenjar getah bening sering terjadi, begitu pula dengan keterlibatan sumsum tulang. Pasien dengan limfoma Burkitt umumnya mengalami gejala pembesaran massa tumor yang cepat. Hal ini disebabkan *doubling-time* tumor yang sangat singkat. Sebanyak 70% pasien limfoma Burkitt terdiagnosis dalam stadium lanjut.

Morfologi limfoma Burkitt klasik menunjukkan sel-sel tumor berukuran sedang yaitu inti sel sebesar atau lebih kecil dibandingkan dengan histiosit. Limfoma Burkitt menunjukkan pola pertumbuhan yang monoton dan difus. Sel-sel tumor tampak kohesif dan menunjukkan *squared-off borders of retracted cytoplasm*. Inti sel bulat dengan kromatin yang bergranal kasar, anak inti multipel, dan terletak parasentral. (Gambar 14). Sitoplasma basofilik dan biasanya mengandung vakuol lemak. Tumor memiliki indeks proliferasi yang tinggi, ditandai dengan banyaknya mitosis dan debris apoptosis. Morfologi limfoma Burkitt biasanya menunjukkan pola *starry-sky* yang dibentuk oleh banyak makrofag jinak yang mencerna sel-sel tumor yang apoptotik. Limfoma Burkitt secara kuat mengekspresikan IgM membran dengan restriksi *light chain* dan antigen sel B seperti CD19, CD20, dan CD22. Selain itu CD10, BCL6, dan CD38 juga dapat terekspresi pada limfoma ini (Gambar 15). Sel tumor biasanya tidak menunjukkan positivitas terhadap BCL2, tetapi positivitas lemah terhadap BCL2 dapat ditemukan pada 20% kasus limfoma Burkitt. Hampir 100% sel tumor positif terhadap Ki67.<sup>34</sup>

#### ***Diffuse Large B-Cell Lymphoma***

Limfoma ini merupakan neoplasma sel limfoid B besar yang memiliki ukuran inti sebesar atau melebihi inti makrofag normal atau lebih dari dua kali ukuran limfosit normal dengan pola pertumbuhan difus. Limfoma ini bersifat heterogen dan telah dibagi ke dalam kelompok-kelompok subtipen berdasarkan variasi morfologi, biologi, dan klinis. *Diffuse large B-cell lymphoma* menyumbang 25-30% dari seluruh limfoma non-Hodgkin pada pasien dewasa di negara-negara barat. Limfoma ini umumnya terjadi pada usia lanjut dengan median dekade ketujuh. *Diffuse large B-cell lymphoma* biasanya muncul *de novo*, namun dapat pula akibat progresi maupun

transformasi dari limfoma lain yang kurang agresif seperti *chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma* (CLL/SLL), limfoma folikular, limfoma zona marginal, atau *nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma* (NLPHL).

Massa tumor pada DLBCL dapat tumbuh di kelenjar getah bening maupun organ ekstranodal. Keterlibatan ekstranodal paling sering terjadi di saluran gastrointestinal seperti lambung dan regio ileosekal. Keterlibatan sumsum tulang dilaporkan terjadi pada 11-27% kasus. Pasien dengan DLBCL biasanya menunjukkan gejala pembesaran massa tumor yang cepat. Tumor dapat berupa massa tunggal atau multipel di kelenjar getah bening maupun ekstranodal. Hampir 50% kasus didiagnosis pada saat stadium I atau II.

Kelenjar getah bening menunjukkan proliferasi difus sel limfoid besar dengan arsitektur yang menghilang secara total maupun sebagian. Sitomorfologi DLBCL beragam dan dibagi ke dalam varian umum (sentroblastik, imunoblastik, dan anaplastik) serta jarang. Varian sentroblastik merupakan varian yang paling umum dijumpai. Sentroblas adalah sel limfoid berukuran sedang hingga besar dengan inti vesikular berbentuk oval atau bulat dan mengandung kromatin halus. Anak inti berjumlah dua hingga empat dan terikat pada membran inti. Sitoplasma umumnya sedikit dan amofilik hingga basofilik. Sebagian besar kasus DLBCL varian sentroblastik, tumor tampak polimorfik dengan percampuran sentroblas dan imunoblas (Gambar 16). Varian imunoblastik dari DLBCL menunjukkan 90% sel berupa imunoblas dengan anak inti tunggal yang terletak sentral dan sitoplasma basofilik, sedangkan varian anaplastik ditandai dengan sel berbentuk bulat, oval, atau poligonal yang berukuran besar hingga sangat besar. Inti sel pleiomorfik *bizarre* menyerupai Hodgkin dan/atau sel Reed-Sternberg (Gambar 17).<sup>35</sup>

DLBCL mengekspresikan penanda pan B-cell seperti CD19, CD20, CD22, CD79a, dan PAX5. Imunoglobulin permukaan dan/atau sitoplasmik (IgM>IgG>IgA) ditunjukkan pada 50-75% kasus. Positivitas terhadap CD30 ditemukan pada DLBCL varian anaplastik. Penanda imunohistokimia lain yang dapat memberikan hasil positif pada DLBCL antara lain CD10 (10%), BCL6 (60%), BCL2 (20%), CD43 (20%), CD5 (<10%), CD30 (10%), IRF4/MUM1 (40%), dan p53 (30%). Penanda Ki67 juga dapat memberikan hasil positif pada

30-90% sel. Positivitas kuat terhadap MYC pada DLBCL dapat disebabkan oleh translokasi atau amplifikasi MYC.<sup>36</sup>

### Prognosis dan keberhasilan terapi THL

Limfoma *high-grade*, termasuk di dalamnya THL dan DHL, memiliki sifat yang sangat agresif dan berprognosis buruk. Median *overall survival* pasien dengan limfoma ini berkisar antara 0,2 – 1,5 tahun.<sup>5</sup> Hasil yang buruk ini dipikirkan sebagai akibat dari kombinasi mutasi gen MYC yang merupakan sinyal proliferasi poten dan mutasi BCL2 yang menyebabkan peningkatan *survival* sel. Kedua mutasi tersebut juga berkaitan dengan resistensi THL terhadap kemoterapi.<sup>15</sup> Berbagai literatur yang mempelajari kesintasan pasien DHL telah membuktikan inferioritas prognosis limfoma ini dibandingkan dengan limfoma sel B lainnya. Studi terhadap 20 kasus DHL dengan kontrol limfoma Burkitt dan IPI-matched DLBCL menunjukkan *overall survival* DHL yang lebih rendah dibandingkan kedua kontrol tersebut.<sup>2,37</sup> Prognosis THL secara umum dianggap lebih buruk daripada DHL, meskipun hal ini masih menjadi kontroversi.<sup>4</sup> Perbedaan pendapat mengenai prognosis THL tersebut dikemukakan Landsburg dkk<sup>7</sup> yang menemukan bahwa *outcome* pasien THL tidak berbeda dengan pasien BCL2-DHL.

Prognosis buruk THL turut dipengaruhi oleh rendahnya respon limfoma ini terhadap kemoterapi. Penelitian terhadap 11 kasus THL menunjukkan resistensi limfoma ini terhadap berbagai agen kemoterapi, seperti R-CHOP, R-EPOCH, hyper-CVAD, dan R-DHAP. Tiga kasus THL sama sekali tidak berespon terhadap kemoterapi, sedangkan empat kasus lainnya menunjukkan respon parsial dengan penyakit yang persisten. Remisi lengkap ditemukan hanya pada dua kasus yang mendapat kemoterapi R-EPOCH.<sup>28</sup>

Skema terapi efektif untuk THL belum ditemukan hingga saat ini.<sup>15</sup> Pengobatan dengan kemoterapi R-CHOP diketahui memiliki keberhasilan yang rendah. Beberapa studi retrospektif menunjukkan keunggulan regimen DA-EPOCH-R dalam meningkatkan kesintasan pasien dengan limfoma agresif. Peningkatan kesintasan juga dapat diperoleh dengan melakukan transplantasi sel punca setelah pasien mengalami remisi lengkap. Sayangnya, studi mengenai alternatif terapi ini masih belum cukup untuk membangun sebuah alur terapi efektif untuk THL/DHL.<sup>32</sup>

### RINGKASAN

THL merupakan neoplasma sel B matur dengan karakteristik utama berupa mutasi gen MYC, BCL2, dan BCL6. Limfoma ini bersifat agresif, memiliki prognosis yang buruk, serta cenderung resisten terhadap kemoterapi. Aspek klinikopatologis THL dipengaruhi oleh mutasi gen yang mendasari patogenesisnya. Mutasi MYC menyebabkan peningkatan proliferasi sel tumor, sedangkan mutasi BCL2 meningkatkan kemampuan sel tumor menghindar dari apoptosis. Mutasi BCL6 menyebabkan respon sel terhadap kerusakan DNA terhambat. Gambaran histopatologik THL berupa sebuah spektrum antara morfologi yang serupa dengan DLBCL dan serupa dengan limfoma Burkitt. Pemeriksaan IHK dan sitogenetik seperti FISH diperlukan untuk mengkonfirmasi keberadaan *rearrangement* ketiga gen tersebut. Saat ini belum ditemukan terapi yang efektif bagi THL, meskipun regimen kemoterapi DA-EPOCH-R dan transplantasi sel punca pada beberapa studi diketahui dapat meningkatkan kesintasan pasien THL.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan tinjauan pustaka ini. Ucapan terima kasih juga saya tujuhan kepada Dra. Supri Irianti Handayani, MS dan dr. Agnes Stephanie, SpPA yang telah meluangkan waktu untuk membimbing saya dalam pembuatan tinjauan pustaka ini. Terima kasih juga saya tujuhan kepada rekan-rekan peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi yang telah ikut memberikan masukan dan dukungan selama proses pembuatan tinjauan pustaka ini. Semoga tinjauan pustaka ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375-90.
2. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012;118:4173-83.

3. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *Ca Cancer J Clin.* 2016;66:443-59.
4. Pemmaraju N, Gill J, Gupta S, Krause JR. Triple-hit lymphoma. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2014;27:125-7.
5. Xu X, Zhang L, Wang Y, Zhang Q, Zhang L, Sun B, et al. Double-hit and triple-hit lymphomas arising from follicular acquisition of MYC: report of two cases and literature review. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6:788-94.
6. Mushtaq S, Singhi EK, Stuart RK. "Triple-triple" hit lymphoma. *Case Rep Intern Med.* 2015;2:78-80.
7. Landsburg DJ, Petrich AM, Abramson JS, Sohani AR, Press O, Cassaday R, et al. Impact of oncogene rearrangement patterns on outcomes in double-hit non-Hodgkin lymphoma patients. *Cancer.* 2016;122:559-64.
8. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica.* 2009;94:935-43.
9. Chen BJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. Small molecules targeting c-myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int J Biol Sci.* 2014; 10:1084-96.
10. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene.* 2001;20:5595-610.
11. Kiaei A, Onsori H, Alijani A, Andalib S, Ghorbian S, Sakhinia E. Detection of t(8;14) c-myc/IgH gene rearrangement by long-distance polymerase chain reaction in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2016;9:141-6.
12. Ioachim HL, Medeiros LJ. Molecular diagnosis. In: Ioachim HL, Medeiros LJ, editors. *Ioachim's Lymph Node Pathology.* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. 59-73.
13. Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene.* 2008;27:6462-72.
14. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:5546-53.
15. Petrich AM, Nabhan C, Smith SN. MYC-associated and double-hit lymphomas: a review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer.* 2014; 120: 3884-95.
16. Tomita N. BCL2 and MYC dual-hit lymphoma/leukemia. *J Clin Exp Hematopathol.* 2011;51:7-12.
17. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Cell injury, cell death, and adaptations. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins Basic Pathology.* 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. p. 1-28.
18. Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003; 22: 8590-607.
19. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene.* 2008; 27: 6398-406.
20. Delbridge ARD, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015;22:1071-80.
21. Pernick N. Stains: BCL2. *PathologyOutlines Inc;* 2017 [cited 2017 1 June]. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsbcl2.html>.
22. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol.* 2011;28:167-77.
23. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev.* 2012;247:172-83
24. Ci W, Polo JM, Melnick A. B-cell lymphoma 6 and the molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15:381-90
25. US National Library of Medicine. BCL6 gene. National Institute of Health. 2017. [cited 2017 5 April]. Available from: [https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCL6#condition\\_s](https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCL6#condition_s).
26. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol.* 2010;105:193-210.
27. Kluit P, Schuurings E. Molecular cytogenetics of lymphoma: where do we stand in 2010?. *Histopathology.* 2011;58:128-44.
28. Wang W, Hu S, Lu X, Young KH, Medeiros J. Triple-hit B-cell lymphoma with MYC, BCL2, and BCL6 translocations/rearrangements clinicopathologic features of 11 cases. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:1132-9.
29. Chan ACL, Chan JKC. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Arber DA, Campo

- E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L, editors. *Hematopathology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 423-4.
30. Yan LX, Liu YH, Luo DL, Zhang F, Cheng Y, Luo XL, et al. MYC Expression in Concert with BCL2 and BCL6 Expression Predicts Outcome in Chinese Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified. *PLoS ONE*. 2014;9:1-16.
31. Kluin PM, Harris NL, Stein H, Leoncini L, Raphael M, Campo E, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, editors. *WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues*. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: WHO; 2008. p. 265-6.
32. Sarkozy C, Traverse-Glehen A, Coiffier B. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol*. 2015;16:555-67.
33. Smith SM. Impact of double-hit and double-expressor phenotypes in relapsed aggressive B-cell lymphomas treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35:1-3.
34. Leoncini L, Raphael M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM. Burkitt lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, editors. *WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues*. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: WHO; 2008. p. 262-4.
35. Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, editors. *WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues*. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: WHO; 2008. p. 233-7.
36. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need?. *Mod Pathol*. 2013;26:42-56.
37. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Cin PD, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2011; 34: 327-40.