

Rozprawa habilitacyjna

Znaczenie zmienności w obrębie cytogenetycznych aberracji pierwotnych w wybranych typach nowotworów człowieka

Barbara Pieńkowska-Grela

Molekularnym podłożem procesu nowotworowego są zmiany w strukturze i funkcjonowaniu aparatu genetycznego komórki. Morfologicznym wyrazem tych zmian są nieprawidłowości kariotypu, widoczne w obrazie aberrantnych chromosomów metafazowych. Poznanie składu specyficznych chromosomów markerowych i określenie genów, których funkcjonowanie zostało zmienione w efekcie powstałej aberracji ma podstawowe znaczenie dla poznania mechanizmów karcinogenezy. Przedstawione badania prowadzono technikami cytogenetyki klasycznej i równoległe, techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ. W analizie FISH stosowano sondy komercyjne i konstruowane samodzielnie, na matrycy odcinków DNA, odpowiadających obszarom zmian. Badano spektrum zmienności w obrębie cytogenetycznej zmiany pierwotnej, określonej jako specyficzna dla: zarodkowych guzów jąder – powielenie obszaru 12p, chłoniaka z komórek płaszczka – translokacja $t(11;14)(q13;q32)$, chłoniaka Burkitt'a – $t(8;14)(q24;q32)$ oraz przewlekłej białaczki szpikowej – $t(9;22)(q34;q11)$. Stwierdzona heterogenność aberracji pierwotnych świadczy o możliwości funkcjonowania równoległych mechanizmów genetycznych, prowadzących do powstania komórki nowotworowej o określonym fenotypie. Podjęto próby określenia zakresu zmienności w obszarze cytogenetycznej zmiany pierwotnej, w tym: ustalenie morfologii zmiany specyficznej w zarodkowych guzach jąder; określenie zmian cytogenetycznych w grupie chłoniaków z pogranicza BL/DLBCL, o morfologii chłoniaka Burkitt'a, a bez rearanżacji genu MYC. W przewlekłej białaczce szpikowej badano skutek obecności submikroskopowej delecji w obszarze fuzyjnego genu ABL/BCR oraz rolę typu transkryptu genu fuzyjnego BCR/ABL. Stwierdzono, że powielenie materiału krótkiego ramienia chromosomu 12 występuje we wszystkich guzach zarodkowych jądra. Realizowane jest ono najczęściej w postaci klasycznego markera $i(12p)$, zaś w przypadkach zmian substytutynych o zróżnicowanej morfologii określono obszar powielenia jako $12p11-12$ oraz $12p13$. W grupie chłoniaków o morfologii chłoniaka Burkitt'a wykryto nowy, powtarzalny marker chromosomowy, pochodzący z chromosomu 11. Taka aberracja: $dup(11)(q23q13)$ może mieć praktyczne znaczenie dla reklasyfikacji wysoce niejednorodnej grupy chłoniaków z pogranicza BL i DLBCL. W przewlekłej białaczce szpikowej w trakcie długotrwałego leczenia imatinibem u pacjentów z delecją obszaru ABL/BCR wykazano częstsze występowanie ewolucji kariotypu, w porównaniu do pacjentów nie wykazujących tej cechy. Potwierdzono korzystne znaczenie rokownicze transkryptu typu $b2a3$ w fuzji BCR/ABL. Różne mechanizmy zaburzenia funkcjonowania genów zaangażowanych w patogenezę określonego nowotworu, widoczne jako modyfikacje zmiany pierwotnej, mogą skutkować zróżnicowanym przebiegiem choroby u poszczególnych pacjentów z tą samą diagnozą.

Significance of variability in primary cytogenetic aberrations in selected types of human malignancies

The molecular bases of malignant processes lie within the structure and function of the genetic system of the cell, while its morphological expression takes the form of karyotype anomalies, frequently visible as abnormalities in metaphase chromosome morphology. It is essential to understand the structure of specific marker chromosomes and to determine genes which functions have been altered as a result of the aberration, in order to fully understand the mechanisms of carcinogenesis. The presented studies have been performed using both classical cytogenetic techniques and parallel fluorescent in situ hybridisation. We were using both commercially available probes and self-constructed, unique probes made on a base of DNA sections that correspond the altered areas. We have studied the variability of the primary cytogenetic aberration, assumed specific for the following malignancies: testicular germ cell tumours – multiplication of the 12p area;

mantle cell lymphoma – translocation t(11;14)(q13;q32); Burkitt's lymphoma – t(8;14)(q24;q32), and chronic myeloid leukaemia – t(9;22)(q34;q11). The variability within primary cytogenetic changes is indicative of the possibility of parallel genetic mechanisms to be in activity, leading to the formation of a malignant cell of a determined phenotype. We have analysed the variability within the primary cytogenetic anomaly area, more specifically: to determine the morphology of the specific anomaly in testicular germ cell tumours; to define the cytogenetic abnormalities within the group of BL/DLBCL lymphomas, with Burkitt's lymphoma morphology, but without the MYC gene rearrangement. In chronic myeloid leukemia we tried to determine the effect of submicroscopic deletion within the fusion area of the ABL/BCR gene and to assess the type of transcript of the BCR/ABL gene.

We showed that a multiplication of the material of the short arm of chromosome 12 occurs in all testicular germ cell tumours. It usually appears as a classic i(12p) marker. In substitutive markers with variable morphology the multiplication areas have been determined as 12p11-12 and 12p13. Within the group of lymphomas with Burkitt's morphology, we have discovered a new recurrent chromosomal marker, originating from chromosome 11. Such an aberration – dup(11)(q23q13) – may have a practical implication for the re-classification of the highly heterogeneous group of lymphomas with features intermediate between DLBCL and BL. During long-term imatinib treatment of chronic myeloid leukemia we have noted a more frequent occurrence of karyotype evolution in patients with a deletion within the ABL/BCR area, as compared with patients without that particular feature. We have confirmed the beneficial prognostic value of the b2a3 transcript in the BCR/ABL fusion. A variety of mechanisms of disturbance a genes functions, that determine the pathogenesis of a specific malignancy, evidenced as modifications of primary aberrations, may result in an altered course of the disease in various patients with the same initial diagnosis.

Słowa kluczowe: chromosom, aberracja, zmiana pierwotna, chłoniaki nieziarnicze, przewlekła białaczka szpikowa, zarodkowy guz jądra

Key words: chromosome, aberration, primary change, non-Hodgkin's lymphoma, chronic myeloid leukemia, testicular germ cell tumor

Wykaz ważniejszych skrótów

Geny:

<i>ABL</i>	<i>ABL1, v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
<i>ASS</i>	<i>ASS1 (argininosuccinate synthetase 1)</i>
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint cluster region</i>
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1 (vel PRAD1: parathyroid adenomatosis 1 vel BCL1: B-cell leukemia/lymphoma 1)</i>
<i>IGH</i>	<i>Immunoglobulin Heavy</i>
<i>IGK</i>	<i>Immunoglobulin Kappa</i>
<i>IGL</i>	<i>Immunoglobulin Lambda</i>
<i>MLL</i>	<i>Myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia</i>
<i>MYC</i>	<i>MC29 avian myelocytomatosis virus</i>

Klasyfikacja nowotworów:

<i>ALL</i>	<i>ostra białaczka limfoblastyczna (acute lymphoblastic leukemia)</i>
<i>BL</i>	<i>chłoniak Burkitt'a (Burkitt's lymphoma)</i>
<i>BL/DLBCL</i>	<i>chłoniak graniczny (B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL)</i>
<i>CML</i>	<i>przewlekła białaczka szpikowa (chronic myeloid leukemia)</i>
<i>DLBCL</i>	<i>chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (diffuse large B-cell lymphoma)</i>
<i>MCL</i>	<i>chłoniak z komórek płaszczka (mantle cell lymphoma)</i>
<i>NHL</i>	<i>chłoniak nieziarniczy (non-Hodgkin's lymphoma)</i>
<i>NS</i>	<i>nienasieniak (nonseminoma)</i>
<i>SE</i>	<i>nasieniak (seminoma)</i>
<i>TGCT</i>	<i>zarodkowy guz jądra (testicular germ cell tumor)</i>

Inne:

<i>FISH</i>	<i>technika fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (fluorescent in situ hybridization)</i>
<i>Ph</i>	<i>chromosom Philadelphia</i>
<i>D-FISH</i>	<i>sonda DNA z podwójnym sygnałem fuzyjnym (double fusion signal)</i>

Spis treści

1. Wstęp	341
1.1. Etiopatogeneza nowotworów	
1.2. Aberracje kariotypowe	
1.2.1. Zmiany zrównoważone	
1.2.1.1. Aberracje prowadzące do deregulacji ekspresji genu	
1.2.1.2. Aberracje prowadzące do fuzji genowej	
1.2.2. Zmiany niezrównoważone	
2. Materiał i metody badawcze	344
2.1. Uzyskanie figur podziałowych (metafaz) i analiza kariotypowa	
2.2. Analiza FISH (<i>Fluorescent in situ hybridization</i>)	
2.3. Diagnoza nowotworu i selekcja przypadków	
3. Omówienie wyników własnych	345
3.1. Mechanizmy deregulacji ekspresji genu <i>MYC</i>	
3.1.1. Translokacje wariantowe	
3.1.2. Powielenie liczby kopii genu	
3.1.3. Zmiana substytutywna	
3.1.4. Modyfikacja potranskrypcyjna	
3.2. Mechanizmy deregulacji ekspresji genu <i>CCND1</i>	
3.2.1. Translokacje wariantowe	
3.2.2. Zmiana substytutywna	
3.3. Zmienność w obszarze genów fuzyjnych	
3.3.1. Submikroskopowa delecja w obszarze genu fuzyjnego <i>ABL/BCR</i>	
3.3.2. Punkt pęknięcia w genie fuzyjnym <i>BCR/ABL</i>	
3.4. Powielenie materiału 12p : i(12p) i aberracje substytutywne	
4. Znaczenie badań cytogenetycznych w praktyce klinicznej	349
4.1. Chłoniaki nieziarnicze	
4.2. Przewlekła białaczka szpikowa	
4.3. Zarodkowy guz jądra	
5. Piśmiennictwo	351
6. Publikacje z badań własnych związane z tematem artykułu i przedstawione jako rozprawa habilitacyjna	352

1. Wstęp

1.1. Etiopatogeneza nowotworów

Molekularnym podłożem procesu nowotworowego są zmiany w strukturze i funkcjonowaniu aparatu genetycznego komórki. Intensywne badania doprowadziły do wykrycia ponad 150 genów, których zmiana funkcji bądź budowy związana jest z procesami powstania i progresji nowotworów [1, 2]. Morfologicznym wyrazem takich zmian genetycznych są aberracje kariotypowe, widoczne w obrazie aberrantnych chromosomów metafazowych. Znaczna część znanych, klonalnych aberracji chromosomowych jest specyficznym związana z określonym typem nowotworu. Niektóre z nich uznawane są za krytyczne, determinujące powstanie nowotworu na poziomie genetycznym. Poznanie składu specyficznych chromosomów markerowych i określenie genów, których funkcjonowanie zostało zmienione w efekcie powstałej aberracji, ma podstawowe znaczenie dla poznania mechanizmów karcinogenezy, pozwalając niekiedy na określenie genetycznej zmiany pierwotnej, odpowiedzialnej za powstanie fenotypu nowotworowego komórek.

W procesie transformacji nowotworowej dochodzi do modyfikacji aktywności określonych genów w wyniku aktywacji onkogenów, inaktywacji genów supresorowych czy fuzji genowych. Zaburzenie, uchwytnie na poziomie detekcji metodami cytogenetycznymi, może być efektem zmian ilościowych bądź jakościowych. Zmiany ilościowe obejmują zwielokrotnienie lub utratę kopii określonych genów. Transpozycje molekularne objawiają się najczęściej w strukturalnych anomaliach chromosomowych, będących swoistymi markerami nowotworu. W komórkach nowotworu widoczne są odstępstwa od obrazu prawidłowego, cytogenetycznie wyrażające się jako nieprawidłowości kariotypu. Wzór aberracji cytogenetycznych jest odmienny w różnych typach nowotworów. Wykazuje on szerokie spektrum: od pojedynczych zmian strukturalnych bądź liczbowych do głębokich, licznych uszkodzeń kariotypu (*complex karyotype*). Do chwili obecnej opublikowano ponad 56000 przypadków nowotworów z aberracjami klonalnymi, a identyfikacja nowych zmian kariotypowych wciąż uzupełnia wiedzę w zakresie karcinogenezy [3].

Poznanie mechanizmów powstawania nowotworu zapoczątkowało określenie translokacji t(9;22) jako zmiany związanej z przewlekłą białaczką szpikową (*chronic myeloid leukemia, CML*). Jej odkrycie było pierwszą obserwacją związku między specyficzną zmianą chromosomową a określonym typem nowotworu. Nieprawidłowy, mały chromosom, widoczny w komórkach pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, nazwany chromosomem Philadelphia, odkryty został w latach 60. XX wieku przez Nowela i Hungerforda [4]. W 1967 r. w kilku przypadkach chłoniaka Burkitt'a (*Burkitt's lymphoma – BL*) zaobserwowano zmianę strukturalną jednego z chromosomów grupy C, którą niemal 10 lat później zdefiniowano jako translokację pomiędzy chromosomami 8 i 14 [5]. W wielu innych typach białaczek i chłoniaków obecność określo-

nej aberracji chromosomowej jest obecnie podstawą diagnozy (klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia, *The World Health Organization – WHO*, 2008) [6]. Jednak, szczególnie w nowotworach rzadkich, precyzyjne określenie pierwotnej zmiany cytogenetycznej jest nadal tematem otwartym.

Określenie etiopatogenezy wielu guzów litych jest nadal kwestią przyszłości, tym bardziej, że wykrycie specyficznej aberracji kariotypu stanowi tu poważne wyzwania techniczne. Komórki uzyskane z guzów litych są trudno dostępne do analizy cytogenetycznej, ze względu na sposób pobrania (jednorazowo, w trakcie usunięcia guza), a także trudności ze wzrostem komórek nowotworowych w hodowli *in vitro* i uzyskaniem metafaz o jakości pozwalającej na szczegółową analizę morfologii chromosomów metafazowych. Kariotypy takich nowotworów wykazują zwykle mnogość zmian liczbowych i strukturalnych, dlatego ewentualne zmiany pierwotne maskowane są obecnością licznych zmian wtórnych, z których znaczną część stanowią zmiany niespecyficzne, akumulowane w komórce w trakcie progresji guza.

Ostatnie lata wniosły ogromny postęp w rozwoju badań biologicznych, które pozwoliły zgłębić istotę mechanizmów prowadzących do transformacji nowotworowej. Przyczynił się do tego rozwój immunologii, dzięki której poznano strukturę oraz zasady funkcjonowania układu odpornościowego, a przede wszystkim nastąpił postęp w dziedzinie badań molekularnych, w tym cytogenetyki molekularnej, które odkryły i wciąż odkrywają genetyczne aspekty patogenezy i progresji nowotworów.

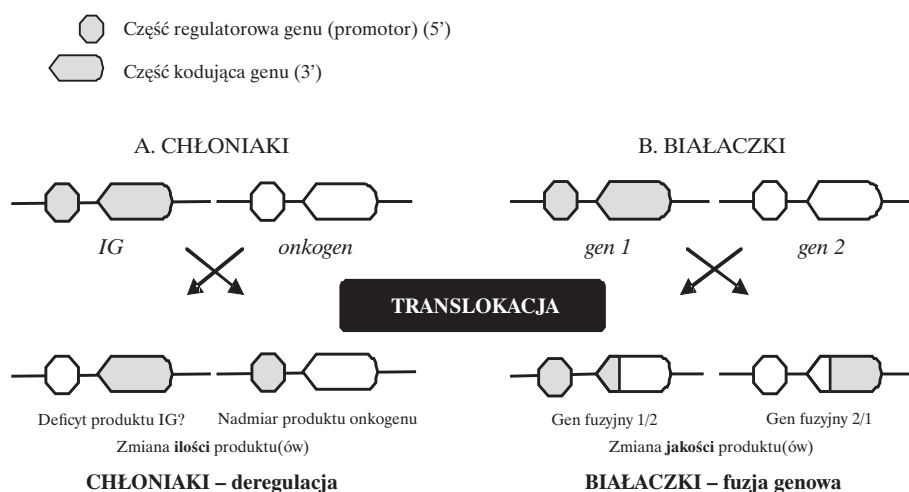
1.2. Aberracje kariotypowe

Wśród nieprawidłowości wykrywanych klasyczną metodą cytogenetyki – kariotypowaniem, wyróżnić można dwie zasadnicze grupy: aberracje zrównoważone (*balanced*) i niezrównoważone (*unbalanced*). Badanie techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridization, FISH*) przy użyciu sond DNA, jedno-, dwu- i wielokolorowych, komplementarnych do określonych obszarów genomu, pozwala na określenie liczby kopii i statusu rearanżacyjnego znakowanego genu, a także określenie zmian liczby kopii i morfologii poszczególnych chromosomów.

1.2.1. Zmiany zrównoważone

Kariotypowe zmiany zrównoważone to najczęściej translokacje wzajemne. W zależności od funkcjonalnych konsekwencji, translokacje chromosomowe można podzielić na dwa zasadniczo odmienne typy (Ryc. 1): A. powodujące deregulację ekspresji genu o prawidłowej strukturze – w większości chłoniaków oraz B. prowadzące do powstania hybridowego genu fuzyjnego – w większości białaczek.

Efektom translokacji prowadzących do przeniesienia nienaruszonej części kodującej onkogenu w pobliże silnych elementów regulatorowych jest podwyższona ekspresja onkogenu i (nad)produkcja kodowanego przez nie



Ryc. 1. Schemat efektu translokacji prowadzącej do: A – przeniesienia części kodującej genu w rejon obcej sekwencji regulatorowej (rearanżacja onkogenu), B – fuzji genowej (gen hybrydowy)

białka (Ryc. 1A). W agresywnych chłoniakach B-komórkowych aktywacja (*heterotopic deregulation*), prowadząca do ekspresji fizjologicznie nieaktywnego protoonkogenu, powoduje pojawienie się białka nieobecnego w prawidłowych limfocytach (cyklina D1 w chłoniaku z komórek płaszczka, białko MYC w chłoniaku Burkitt'a) [7].

Zasadniczy mechanizm leukemogenezy jest odmienny. W białaczkach, na skutek fuzji genowych i utworzenia genu hybrydowego, dochodzi do powstania nieprawidłowego białka, fizjologicznie nieistniejącego w komórce (Ryc. 1B) [8]. Konsekwencją takich nieprawidłowości funkcjonowania i struktury genów są zaburzenia regulacji cyklu komórkowego, różnicowania i dojrzewania komórek, prowadzące do powstania fenotypu nowotworowego.

1.2.1.1. Aberracje prowadzące do deregulacji ekspresji genu

Przykładem translokacji wzajemnej, prowadzącej do rearanżacji onkogenu, jest translokacja t(8;14)(q24;q32) w chłoniaku Burkitt'a. W rezultacie translokacji t(8;14)(q24;q32) dochodzi do przeniesienia części kodującej genu *MYC* (lokalizacja 8q24) w region regulatorowy genu ciężkiego łańcucha immunoglobulin *IGH* (14q32) lub wariantowo, w sąsiedztwo genów łańcuchów lekkich lambda *IGL* (22q11) lub kappa *IGK* (2p12) [9]. Z genu *MYC* przenoszone są zwykle dwa egzony końca 3', natomiast egzony zawierający informację o stabilności transkryptu (z końca 5') pozostaje na chromosomie 8. Translokacja (8;14)(q24q32) jest aberracją występującą w ponad 80% przypadków BL, a translokacje wariantowe: t(8;22)(q24; q11) lub t(2;8)(p12;q24) pojawiają się rzadko (odpowiednio w około 10% i 5% wszystkich przypadków BL). Gen *MYC* koduje białko jądrowe, pełniące rolę czynnika transkrypcyjnego, które stymuluje podziały komórkowe oraz bierze udział w procesach replikacji, różnicowania i apoptozy. Nadprodukcja białka MYC prowadzi do nadmiernego wzrostu klonu komórek obciążonych aberracją. Translokacja t(8;14) nie jest specyficzna

dla BL, z niską częstością notowana jest również w innych nowotworach, zwykle będąc sygnałem progresji/wzrostu agresywności [10, 11].

Zmianą pierwotną, prowadzącą do powstania chłoniaka z komórek płaszczka (*mantle cell lymphoma, MCL*) jest wzajemna translokacja t(11;14)(q13;q32), powodującą rearanżację genu *CCND1* i charakterystyczną ekspresję cykliny D1 [12]. Zdefiniowanie punktów pęknięcia chromosomów, biorących udział w tej translokacji, potwierdziło zaangażowanie genów *IGH* (14q32) na chromosomie 14 oraz genu określonego początkowo jako *BCL1* (11q13) (*B-cell leukemia/lymphoma 1*) na chromosomie 11 [13]. Dalsze badania pozwoliły określić białko kodowane przez ten gen jako cyklinę D1, a kodujący gen nazwano *CCND1* (*cyclin D1*) [14]. Protoonkogen *CCND1*, dostając się pod kontrolę elementów promotorowych *IGH*, ulega aktywacji i nabiera cech onkogennych. Translokacja t(11;14) prowadzi w rezultacie do nadekspresji cykliny D1. Cyklina D1, tworząc kompleksy z kinazami CDK4 bądź CDK6, jest odpowiedzialna za fosforylację białka RB1 i zniesienie jego funkcji inhibitora, co umożliwia przejście komórek z fazy G1 cyklu komórkowego do fazy syntezy [2]. W prawidłowych komórkach limfocytarnych cyklina D1 nie ulega ekspresji, zaś za przejście G1/S odpowiadają cyklina D2 i cyklina D3. Znaczenie roli translokacji t(11;14) w rozwoju MCL nie jest ostatecznie wyjaśnione. Doświadczenia na transgenicznym zwierzętach wykazały, że translokacja ta jest konieczna, ale niewystarczająca dla rozwoju nowotworu [15].

1.2.1.2. Aberracje prowadzące do fuzji genowej

Przykładem translokacji wzajemnej, prowadzącej do powstania genu hybrydowego jest translokacja t(9;22)(q34;q11), która jako zmiana pierwotna stanowi przyczynę powstania przewlekłej białaczki szpikowej [16]. W obrazie cytogenetycznym, translokacja t(9;22)(q34;q11) manifestuje się obecnością chromosomów pochodnych: skróconego chromosomu 22 [der(22)], zwanego chromosomem Philadelphia (Ph) oraz der(9),

będącego wydłużonym chromosomem 9. Rezultatem pęknięć w regionach 9q34 (lokalizacja genu *ABL*) i 22q11 (lokalizacja genu *BCR*) jest powstanie fuzyjnego genu *BCR/ABL*, którego produktem jest patogenne białko p210^{bcr-abl} (wyjątkowo 190^{bcr-abl} lub 230^{bcr-abl}), o podwyższonej aktywności kinazy tyrozynowej [17]. Gen *ABL* (*ABL1*, *v-abl* *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) wyróżnia się dużą zmiennością punktu pęknięcia, które zachodzi w obszarze obejmującym ponad 300 kpz. Miejsca pęknięć (*breakpoint cluster region*) genu *BCR* są ściśle określone. U większości chorych na CML stwierdza się pęknięcie w obszarze M-bcr (*major breakpoint cluster region*), u niewielkiej zaś liczby w m-bcr (*minor breakpoint cluster region*) i sporadycznie w μ -bcr (*micro breakpoint cluster region*). W następstwie złamania genu w regionie M-bcr powstają dwa najczęstsze rodzaje transkryptów: b3a2 lub b2a2 odpowiedzialne za kodowanie białka p210. Pęknięcie w m-bcr jest typowe dla ostrej białaczki limfoblastycznej; w CML występuje bardzo rzadko i ma związek z obrazem mielomonocytnym (transkrypt e1a2, białko 190^{bcr-abl}). Pęknięcia w obszarze μ -bcr występują niezmiernie rzadko, tworząc obraz kliniczny przewlekłej białaczki neutrofilowej (transkrypt e19a2, białko p230^{bcr-abl}).

Obecność i akumulacja w komórce produktu chimerycznego genu *BCR/ABL* prowadzi do nadmiernej aktywacji białek, istotnych dla procesu regulacji wzrostu komórek. Ponadto, obecność białka BCR/ABL powoduje obniżenie adherencji komórek hemopoety do podścieliska i macierzy pozakomórkowej szpiku, obniżenie zdolności odpowiedzi na czynniki aktywujące apoptozę, dłuższe życie i wzmoczoną proliferację komórek zmienionych, a także umożliwia opuszczania przez nie szpiku kostnego w postaci niedojrzałej.

Specyficzne translokacje chromosomowe zdefiniowano, jak do tej pory, w licznych nowotworach hematologicznych i tylko w niewielu rodzajach guzów litych. Jednym z nielicznych wyjątków jest mięsak Ewinga (*Ewing's sarcoma*), w którym jako pierwszym, w 1983 roku wykryto swoistą aberrację chromosomową w postaci translokacji t(11;22)(q24;q12) i określono geny zaangażowane w aberrację: gen *EWS* zlokalizowany w 22q12 i gen *FLII* (11q24) [18]. Jedną z kolejnych specyficznych zmian w obszarze guzów litych jest translokacja t(X;18)(p11.2;q11.2) w maziówczaku złośliwym (*Synovial sarcoma*), opisana w 1986 r. przez Limona i wsp. [19]. Współcześnie, głównie dzięki użyciu techniki FISH i metod genetyki molekularnej, wykryto w guzach litych liczne aberracje chromosomowe i geny fuzyjne, których produkty białkowe mają zdolność regulowania procesu transkrypcji DNA, jednak ich rola biologiczna pozostaje w większości przypadków niewiadoma.

1.2.2. Zmiany nie zrównoważone

Do zmian nie zrównoważonych zaliczamy zaburzenia, powodujące utratę części materiału genetycznego (delecje), jak i powielenie genów bądź fragmentów chromosomów

(amplifikacje). Jako przykłady można wymienić odpowiednio: utratę fragmentu długiego ramienia chromosomu 5 (delecja interstycjalna) w Zespole 5q- (*Myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)*), należącej do rozrostów hematologicznych [20] oraz powielenie genu *N-MYC* w nerwiaku zarodkowym współczulnym (*Neuroblastoma*) w grupie guzów litych [21].

W komórkach większości zarodkowych guzów jąder (*testicular germ cell tumor*, TGCT), niezależnie od ich typu utkania histologicznego, obserwowana jest charakterystyczna aberracja strukturalna i(12p), będąca isochromosomem krótkiego ramienia chromosomu 12 [22]. Marker i(12p) jest isochromosomem rzeczywistym, a więc zawiera identyczny materiał genetyczny w obu ramionach, a jego powstanie powoduje – obok powielenia materiału krótkiego ramienia (p) jednej z kopii chromosomu 12 – równoczesną utratę jego długiego ramienia (q). Obecność jednej lub kilku kopii isochromosomu i(12p) obserwowano w ponad 80% zbadanych przypadków guzów jąder, zarówno w nasieniakach (*seminoma*, SE), nienasieniakach (*nonseminoma*, NS), jak i w stadium przedinwazyjnym [23-25]. W guzach pozbawionych tego markera chromosomowego zawsze obecne są zmiany substytutywne, niosące powielony materiał 12p [26, 27]. Sugerowanym mechanizmem karcinogenezy jest tu amplifikacja materiału genetycznego w obszarze 12p11.2-12p12.1 [28].

Jak wynika z powyższego, krótkiego przeglądu stanu wiedzy, zmienność w obrębie cytogenetycznej zmiany pierwotnej jest zjawiskiem znanym, jednak obserwacja licznych przypadków nowotworów skłania mnie do przyjęcia założenia, że spektrum takiej zmienności może być znacznie szersze, w dużym stopniu wpływając na zróżnicowanie przebiegu choroby nowotworowej u poszczególnych pacjentów.

Celem moich badań było poszukiwanie nietypowych form pierwotnych aberracji cytogenetycznych, widocznych na poziomie mikroskopowym i submikroskopowym, których obecność może w istotny sposób zmieniać biologię komórek nowotworu, niezależnie od wpływu aberracji wtórnych, kumulujących się w trakcie progresji. Działanie różnych mechanizmów aktywacji onkogenów czy istnienie zmian submikroskopowych w obrębie genów fuzyjnych może w istotny sposób modulować przebieg choroby czy stopień niestabilności genetycznej komórek nowotworu.

W obszarze działalności praktycznej moim celem jest stałe rozszerzanie zakresu badań diagnostycznych, zgodnie z nowymi osiągnięciami wiedzy, ustalenie wysokiego standardu cytogenetycznych badań diagnostycznych oraz współdziałanie z laboratoriami o różnych profilach diagnostycznych (histopatologia, cytometria przepływową, badania molekularne), co ma podstawowe znaczenie dla jakości rozpoznań oraz usprawnienia i optymalizacji diagnostyki nowotworów człowieka.

2. Materiał i metody badawcze

2.1. Uzyskanie figur podziałowych (metafaz) i analiza kariotypowa

Materiał do analizy cytogenetycznej stanowiły żywe komórki, pobrane z nowotworowo zmienionych narządów, węzłów chłonnych, szpiku kostnego bądź krwi obwodowej pacjentów. Zawiesina takich komórek utrwalana była bezpośrednio po otrzymaniu (preparaty bezpośrednie) oraz po 24, 48 lub 72 godzinach hodowli *in vitro* w przypadku białaczek i chłoniaków, a po 7-14 (średnio) dniach hodowli w przypadku guzów litych.

Hodowla *in vitro* wszystkich typów komórek nowotworowych prowadzona była w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C), w medium hodowlanym z dodatkiem surowicy cielęcej (10-20%), L-glutaminy i antybiotyków. W przypadku hodowli stymulowanych, medium hodowlane zawierało odpowiedni mitogen.

W chłoniakach B-komórkowych materiałem badanym były komórki uzyskane z fragmentów bądź aspiratów zmienionych nowotworowo: węzłów chłonnych, pobranych w trakcie biopsji diagnostycznych (biopsja cienkoigłowa) lub aspiratów szpiku kostnego szpiku. Prowadziłam hodowle niestymulowane i stymulowane. Stosowany mitogen: TPA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*). W przewlekłej białaczce szpikowej materiałem badanym był aspirat szpiku kostnego, pobierany od pacjentów z podejrzeniem CML (diagnostyka) i w trakcie monitorowania leczenia (średnio co 6 miesięcy w okresie leczenia). Prowadziłam hodowle niestymulowane i stymulowane. Stosowany miogen: GCSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, ludzki czynnik pobudzający wzrost kolonii granulocytów). W zarodkowych guzach jąder materiałem były fragmenty guza pobrane śródoperacyjnie, poddane dyspersji (enzymatycznej bądź mechanicznej) i hodowane z dodatkiem insuliny.

Utrwalanie prowadzone było mieszaniną Carnoy'a (metanol: kwas octowy lodowaty vol/vol 3:1). Uzyskane metafazy były poddane barwieniu różnicowemu metodą Wright'a dla uzyskania wzoru prążkowego. Analiza kariotypów odbywała się zgodnie z zaleceniami *International System for Human Cytogenetics Nomenclature* (ISCN). Obserwacje prowadzono w mikroskopie świetlnym przy użyciu obiektywu 100x oil, a analizę wykonywano na powiększonych odbitkach fotograficznych lub z zastosowaniem komputerowego systemu analizy IKAROS, MetaSystems (Niemcy).

2.2. Analiza FISH (*Fluorescent in situ hybridization*)

Technika FISH pozwala na uzyskanie informatywnego obrazu w komórkach dzielących się (metafazy), jak i znajdujących się w fazie spoczynkowej (jądra interfazowe). Hybrydyzacja *in situ* polega na połączeniu znanej, jednoniciowej sekwencji DNA, wyznakowanej fluorochromem (sonda) z komplementarną, jednoniciową sekwencją badanego DNA komórkowego, które w określonych warunkach tworzą stabilną hybrydę. Detekcja sygnału związanej sondy odbywa się w mikroskopie fluorescencyjnym, przy użyciu odpowiednich filtrów i pozwala na ocenę statusu badanych regionów genomu (genów, wybranych obszarów chromosomowych bądź całych chromosomów). Materiałem poddanym badaniu był tu zarówno materiał utrwalony dla uzyskania metafaz (opis powyżej), jak i materiał archiwalny, uzyskany z blozków parafinowych. Dla analizy FISH materiału archiwalnego stosowałam, opracowaną z moim udziałem w naszej pracowni, metodę izolacji jąder komórkowych z grubych skrawków parafinowych (modyfikacja techniki zaproponowanej przez Paternoster, 2002) [29].

Analizę FISH wykonywałam, stosując sondy komercyjne hybrydujące do badanych lokalizacji chromosomowych (firmy: Vysis, Qbiogene, AppliGene, Oncor). Dla definiowania

punktów pęknięć oraz określenia pochodzenia i składu nietypowych aberracji używałam także sond unikalnych, konstruowanych w naszej pracowni z DNA, wyizolowanego z klonów bakteryjnych, zawierających sztuczne chromosomy z wbudowanymi sekwencjami ludzkiego DNA (BAC – *bacterial artificial chromosome*) (dzięki uprzejmości dr I. Włodarskiej, Katolicki Uniwersytet w Leuven, Belgia i dr F. Cavazzini, Uniwersytet w Ferrarze, Włochy), którzy użyczyli mi klonów bakteryjnych i sond BAC. Klony wybrano w oparciu o bazy danych dotyczących genomu człowieka i bibliotek klonów bakteryjnych, zawierających sztuczne chromosomy: *UCSC Genome Browser* oraz *Ensemble Genome Browser* [30]. Preparaty FISH analizowane były w mikroskopie fluoescencyjnym, obiektyw 100x oil, przy użyciu komputerowych systemów analizy obrazu LUCIA (Czechy) i ISIS MetaSystems (Niemcy).

2.3. Diagnostyka nowotworu i selekcja przypadków

Chłoniaki nieziarnicze

Rozpoznanie ustalane było w Zakładzie Patologii Centrum Onkologii – Instytucie w Warszawie (CO-I) na podstawie oceny skrawków parafinowych barwionych hematoksyliną i eozyną, oceny immunohistochemicznej z referencyjnym panelem przeciwciał i z użyciem techniki cytometrii przepływowej (FACS, Becton-Dicinson *immunocytometry system*, Franklin Lakes, NJ), zgodnie z zasadami diagnostyki patologicznej chłoniaków [31]. W sumie wykonałam analizę cytogenetyczną około 200 przypadków agresywnych chłoniaków nieziarniczych B-komórkowych (chłoniak Burkitt'a, chłoniak rozlany z dużych limfocytów B, chłoniak z komórek płaszczka), leczonych lub konsultowanych w Centrum Onkologii w Warszawie w latach 1997-2009. Z grupy tej do szczegółowej analizy wyselekcjonowałam przypadki ze wzorem aberracji lub cechami immunofenotypu, odbiegającymi od typowych.

Chłoniak Burkitt'a

Chłoniak ten wykazuje w obrazie morfologicznym utkanie chłoniaka z populacją komórek średniej wielkości o dużej aktywności proliferacyjnej i apoptozie. Zazwyczaj widoczny jest obraz tzw. gwiaździstego nieba (*starry sky appearance*), związany z obecnością licznych nienowotworowych makrofagów. Immunofenotyp: CD20+, CD79α+, CD10+, Bcl6+, Ki67 około 100%, CD43+/-, Bcl2-, CD5-, CD23-, CD30-, ALK1-, cyklina D1-, TdT-, w badaniu cytometrycznym ekspresja CD45, CD19, CD20, CD22, HLADR, nadekspresja CD10, ~100% populacja komórek CD71+, wysoka frakcja proliferacji (ponad 90% MIB1+++), negatywne wobec CD5, CD23, CD25, CD11c, CD62L i TdT. Niezbędnym potwierdzeniem takiej diagnozy była rearanżacja *MYC*, wykazana w badaniu FISH, lub/i obecność typowych translokacji w badaniu kariotypu. Przypadki odbiegające od tego wzorca były zaliczane do grupy atypowych. Zgodnie z obecną klasyfikacją WHO [6] są to chłoniaki graniczne BL/DLBCL (*B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL*). Wszystkie dostępne przypadki były przeze mnie szczegółowo analizowane technikami cytogenetycznymi.

Chłoniak z komórek płaszczka

Utkanie chłoniaka stanowi populacja komórek małej/średniej wielkości, przypominających centrocyty, zwykle o rozlanym typie wzrostu, czasem z pozostałościami nienowotworowych grudek chłonnych. Immunofenotyp: CD20+, CD79a+, Ki67<40% (zazwyczaj wyższy niż w innych chłoniakach z małych komórek), Bcl2+, CD5+/-, CD43+/-, cyklina D1+, Bcl6-, CD10-, CD23-,

CD30-, ALK1-, TdT-. Chłoniak ujawnia cechy dojrzałych limfocytów B przez ekspresję markerów B-komórkowych: CD19, CD20, CD22, CD79a, z jednoczesną ekspresją antygenów pan-T: CD5 i CD43. Wykazuje też silną ekspresję powierzchniowych immunoglobulin IGM i IGD (częściej λ -pozytywnych, niż κ -pozytywnych). Komórki wykazują charakterystyczny fenotyp z ekspresją CD19, CD20, CD22 i HLDR. Silna ekspresja cykliny D1. Wszystkie dostępne przypadki były szczegółowo analizowane technikami cytogenetycznymi.

Przewlekła białaczka szpikowa

Rozpoznanie w grupie analizowanych przeze mnie przypadków przewlekłej białaczki szpikowej wykonano zgodnie z zaleceniami ekspertów European LeukemiaNet i standardami opracowanymi w imieniu Polskiej Grupy Leczenia Białaczek [32]. Materiałem badania był aspirat szpiku kostnego, pobierany dla rozpoznania oraz w trakcie monitorowania przebiegu leczenia (średnio co 6 miesięcy u każdego pacjenta). Warunkiem rozpoznania była obecność translokacji t(9;22) lub zmiany równoważnej, powodującej fuzję *BCR/ABL*. Rozpoznanie fazy choroby (przewlekła, akceleracji lub kryza blastyczna) wykonywane było w ośrodkach kierujących. Ocena rodzaju transkryptu (techniką RT-PCR, RQ-PCR) przeprowadzona była w wyspecjalizowanych pracowniach biologii molekularnej. Z grupy około 250 pacjentów, diagnozowanych w naszej pracowni w latach 1998-2008, do szczegółowego badania wyselekcjonowałam przypadki z nietypowym obrazem zmian kariotypowych lub/i wzorem znakowania FISH oraz grupę pacjentów, u których szczegółowo analizowałam dynamikę zmian kariotypowych w trakcie wieloletniego monitorowania leczenia imatinibem (inhibitor kinazy tyrozynowej).

Zarodkowe guzy jąder

Badania w grupie zarodkowych guzów jąder prowadziłam na materiale uzyskiwanym w wyniku orchidektomii lub z usuwanych guzów przerzutowych w latach 1992-2002. Do analizy cytogenetycznej zgromadziłam materiał obejmujący ponad 100 przypadków guzów. Materiał pochodził głównie od pacjentów klinik: CO-I oraz CMKP (Warszawa). Diagnoza histopatologiczna (zgodnie z zaleceniami WHO), z określeniem typu utkania histologicznego i stopniem zaawansowania wg klasyfikacji TNM, była dokonywana w odpowiednich Zakładach Patologii.

3. Omówienie wyników własnych

3.1. Mechanizmy deregulacji ekspresji genu *MYC*

3.1.1. Translokacje wariantowe

W zgromadzonym przeze mnie materiale 22 chłoniaków Burkitt'a przeważały przypadki z typową translokacją (8;14)(q24q32), w których doszło do przeniesienia genu *MYC* (lokalizacja 8q24) w region genu ciężkiego łańcucha immunoglobulin *IGH* (14q32). U 4 pacjentów stwierdzono obecność translokacji wariantowej t(8;22) z udziałem genów łańcuchów lekkich lambda *IGL* (22q11). W jednym przypadku ujawniła się t(2;8) z udziałem łańcucha kappa *IGK* (2p12). Badanie kariotypowe i analiza rearanżacji badanych genów były tu w pełni zgodne. Klasyczny obraz, zgodny z oceną cytogenetyczną, wykazywały również wyniki badań immunofenotypowych. Obraz taki i częstość zaangażowania genów łańcuchów lekkich im-

munoglobulin w translokacje wariantowe zgodne są z literaturą przedmiotu i potwierdzają obecność około 20% przypadków z translokacjami wariantowymi, a wśród nich przewagę zaangażowania genów łańcuchów lambda [11].

3.1.2. Powielenie liczby kopii genu *MYC*

W pracy, przedstawiającej analizę aberracji angażujących chromosom 8, opisałam cztery przypadki, zdiagnozowane wstępnie jako chłoniak Burkitt'a, w których wystąpiły nietypowe zmiany strukturalne dotyczące chromosomu 8, z nietypowymi zaburzeniami genu *MYC* [33]. W jednym przypadku ujawniła się translokacja t(8;14)(q22;p11), w której punkty pęknięć nie odpowiadały lokalizacji genów *MYC* i *IGH*. Równocześnie wykazałam brak rearanżacji w obrębie zarówno genu *MYC*, jak i genów łańcuchów immunoglobulin. Jednak komórki chłoniaka ujawniły obecność trzech kopii kompletnego genu *MYC*: dwie na prawidłowych kopiach chromosomu 8 i jedna w opisanym markerze. W drugim przypadku, obok dwóch prawidłowych kopii chromosomu 8, wystąpiła nietypowa translokacja t(1;8)(p34;q24). W markerze tym punkt pęknięcia na chromosomie 8 był zlokalizowany w bezpośrednim sąsiedztwie genu *MYC*, jednak proksymalnie położone pęknięcie nie nastąpiło w obrębie genu. Kompletna kopia *MYC* została więc przeniesiona na krótkie ramię chromosomu 1, bez zajęcia rearanżacji. W kolejnym przypadku nie udało się określić partnera translokacji chromosomu 8, jednak i tu translokacja łączyła się z powieleniem nieuszkodzonej kopii genu *MYC*. W przypadkach tych analiza immunofenotypu nie była w pełni zgodna z BL, natomiast poziom białka *MYC* był wysoki.

Uważa się, że częstość translokacji t(8;14)(q24;q32) w nietypowym chłoniaku Burkitt'a jest zasadniczo zgodna z wykazywaną w BL, a różnica między tymi subtypami polega raczej na obecności zmian wtórnych, głównie t(14;18). Równocześnie niektórzy autorzy notowali powielenie kopii genu *MYC* w przypadkach chłoniaków agresywnych o morfologii Burkitt'a [34, 35]. Nasze badania wykazały istnienie przypadków, w których ekspresji *MYC* towarzyszyły aberracje chromosomu 8 bez typowej t(8,14) i translokacji wariantowych. Wykluczono aktywację genu *MYC* przez element regulatorowy IG. Wspólną cechą tych przypadków okazało się powielenie liczby kopii kompletnego genu *MYC*, co może być uznane za alternatywny mechanizm skutkujący (nad)produkcją białka *MYC*.

3.1.3. Zmiana substytutu

Wśród chłoniaków o morfologii BL i cechach immunofenotypowych odbiegających od klasycznego wzoru, bez rearanżacji genu *MYC*, zaliczonych do grupy chłoniaków granicznych BL/DLBCL (*B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL*), wykazałam obecność nowej, powtarzalnej (4 przypadki) aberracji: markera chromosomowego, niosącego powielony materiał długiego ramienia chromosomu 11: dup(11)(q23q13) [36]. Szczegółowa analiza wykazała, że

powieleniu odcinka pomiędzy prążkami 11q13 a 11q23 towarzyszy odwrócenie (inwersja) zduplikowanego fragmentu. Punkty pęknięć znajdują się w miejscu lokalizacji genów *CCND1* (proksymalnie) i *MLL* (dystalnie), jednak żaden z tych genów nie ulega pierwotnie rearanzacji. Natomiast jako zmiana wtórna pojawia się amplifikacja (8-10 kopii) genu *MLL* lub *CCND1*, albo wtórna rearanzacja *IGH/CCND1*. W badaniu techniką FISH gen *MYC* we wszystkich tych przypadkach nie wykazywał odstępstwa od prawidłowego wzoru znakowania i liczby kopii. Równoczesne podwojenie liczby kopii genów *CCND1* i *MLL* może być funkcjonalnie substytutowe do nadekspresji *MYC*. Dodatkowe znaczenie może mieć powielenie panelu genów zawartych w obszarze duplikacji [37]. W tym obszarze zlokalizowane są również geny pozytywnej regulacji cyklu komórkowego np.: *API 2A* (11q21) o funkcji inhibitora apoptozy, *CASP-1* (q22.3) gen kaspazy, *PAK1* (q13.5) mający wpływ na przeżycie i proliferację komórek, *CHKA* (q13.2) biorący udział w procesach wzrostu i proliferacji komórek czy *CD248* (q13), którego funkcja nie jest jeszcze określona, dowiedziono natomiast jego roli w procesach progresji i przerzutowania na modelu mysim. Istotnym czynnikiem może być również zaburzenie funkcjonowania genów zlokalizowanych w regionie pęknięcia na chromosomie 11 (q13 i q23). Obecność powtarzalnego markera dup(11)(q23q13) może stanowić morfologiczny wyróżnik subtymu chłoniaków o morfologii BL bez rearanzacji *MYC* [36].

3.1.4. Modyfikacja potranskrypcyjna

Jednym z możliwych, alternatywnych mechanizmów zmiany ekspresji genu *MYC* w przypadkach gdzie brak jest zarówno translokacji z zaangażowaniem 8q24, jak rearanzacji i amplifikacji genu *MYC*, jest modyfikacja na poziomie potranskrypcyjnym. W warunkach fizjologicznych regulacja potranskrypcyjna odbywa się za pośrednictwem miRNA. MicroRNA to małe, niekodujące struktury RNA, które działają poprzez blokowanie mRNA lub inhibicję translacji [38]. Wyniki badań ostatnich lat wykazały zaangażowanie miRNA w nowotworach, poprzez ich asocjację w miejscach częstych pęknięć DNA i uczestnictwo w regulacji funkcjonowania onkogenów i genów supresorowych. Obserwacja ta dała asumpt do rozpoczęcia nowego kierunku badań nad poszukiwaniem różnic w profilu ekspresji miRNA w różnych nowotworach [39]. Ostatnie raporty wskazują na znacząco wyższy poziom mikroRNA-155 w różnych chłoniakach z komórek B, w porównaniu z normalnymi limfocytami B, zaś fragmentaryczne i niejasne dane w tym zakresie dotyczą chłoniaka Burkitt'a. We współpracy z Zakładem Immunologii CO-I podjęłam próbę zastosowania ekspresji mikroRNA-155 w różnicowaniu chłoniaka Burkitt'a i chłoniaka rozlanego z dużych komórek B. Wstępne dane wykazały wyraźnie niższy poziom ekspresji mikroRNA-155 w chłoniaku Burkitt'a, w porównaniu z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B, co może wskazywać na możliwość zastosowania oceny poziomu ekspresji mikroRNA-155 w diagnostyce różnicowej tych

dwóch typów nowotworów układu chłonnego [40]. Wyniki dalszych badań w tym obszarze mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia roli mikroRNA-155 w patogenezie nowotworów układu chłonnego.

3.2. Mechanizmy deregulacji ekspresji genu *CCND1*

3.2.1. Translokacje wariantowe

W grupie chłoniaków z komórek płaszczki badaliśmy obecność typowej translokacji t(11;14)(q13;q32), jej korelację z obecnością rearanzacji genów *CCND1* i *IGH* oraz obecność nietypowych wzorów translokacji lub/i rearanzacji zaangażowanych genów. W badanej przez nas grupie chłoniaków MCL typowa translokacja t(11;14) obecna była w kariotypach ponad połowy pacjentów, czemu towarzyszyła klasyczna fuzja *IGH/CCND1*, co odpowiada częstości tej aberracji wykazywanej tą samą metodą w innych laboratoriach [11].

W chłoniaku z komórek płaszczki dochodzi do przeniesienia części kodującej genu z cykliny D1 (*CCND1*, dawniej *BCL1*) w sąsiedztwo promotora *IGH*. Aberracje wariantowe, z udziałem *IGK* czy *IGL*, występują w tym typie chłoniaka sporadycznie [41]. Wykryte przez nas translokacje wariantowe stwierdzono w przypadkach, w których doszło do rearanzacji w regionie 11q13, ale gdzie partnerem translokacyjnym nie był 14q32 (gen *IGH*), lecz inny region chromosomowy. W jednym przypadku ujawniliśmy unikalną translokację t(2;11)(p11;q13) [42]. Analiza FISH wykazała zaangażowanie genu *CCND1* w tej zmianie i jego rearanzację, a badania molekularne i immunohistochemiczne potwierdziły nadekspresję cykliny D1. Jednak kolejne badanie FISH wykluczyły udział *IGK*, prawdopodobny w translokacji t(2;11). Punkt pęknięcia, zlokalizowany na chromosomie 2, w tym przypadku leży w odległości około 1 mpz od *IGK* w kierunku telomeru, w obszarze zawężonym w kolejnych analizach do obszaru około 260 kpz. W rejonie tym jedynym znanym genem jest LOC440871, (*similar to Ig kappa chain V-III region VH precursor*). Należy on do orfonów (*orphons*), grupy genów będących odpowiednikami sekwencji części zmiennej *IGK*, ale leżących poza miejscem zasadniczej lokalizacji *IGKV*. Orfony są pseudogenami, które cechuje obecność defektów w sekwencji (kodony stop, insercje, delecje), jednak gen LOC440871 jest potencjalnie funkcjonalnym, aktywnym genem [43]. Hipoteza, że może on być aktywatorem *CCND1* w wykrytej translokacji, wymaga potwierdzenia.

Drugą wykrytą unikalną aberracją kariotypową, angażującą *CCND1*, była translokacja złożona t(X;11;14;?)(q26;q13;q32;?). Badania FISH potwierdziły występowanie fuzji *CCND1/IGH*, obecnej na zmienionym chromosomie 11, nie stwierdzono natomiast obecności produktu fuzyjnego na zmienionym chromosomie 14, co sugeruje brak fuzji pomiędzy elementami regulatorowymi *IGH*, a elementami kodującymi *CCND1*. Zagadkowy pozostaje tu mechanizm aktywacji *CCND1*, ponieważ

dane uzyskane w wyniku analizy FISH wskazują na to, że sekwencje kodujące tego genu przeniesione zostały na chromosom X, w obszar prążka q26. Sugeruje to możliwość poszukiwania w tym rejonie nieznanego, aktywnego genu odpowiedzialnego za ekspresję *CCND1*.

Mechanizm aktywacji *CCND1*, przebiegający bez zaangażowania regulatorów genów immunoglobulin, może mieć jednak inne podłoże. Deregulacja *CCND1* może być skutkiem delecji bądź mutacji negatywnych elementów regulatorowych, epigenetycznych modyfikacji jak hypometylacja DNA i hiperacetylacja histonów promotora, czy zmiany aktywności zależnych od ATP białek przebudowujących chromatynę [2, 44]. Rozwiązanie tego problemu pozostaje nadal kwestią przyszłości.

3.2.2. Zmiana substytutowa

U czterech chorych z badanej grupy przypadków MCL barwienie immunohistochemiczne wykazało brak ekspresji cykliny D1. U dwóch z nich badanie RT-PCR wykazało podwyższony poziom m-RNA dla cykliny D2. Analiza FISH potwierdziła w jednym z tych przypadków brak zaangażowania genu *CCND1*, natomiast wykazała rearranżację genu *CCND2* i jego przeniesienie w region genu *IGL*, prowadząc do unikalnej fuzji *IGL/CCND2* (praca w przygotowaniu).

Występowanie przypadków MCL bez ekspresji *CCND1*, a tym samym bez rearanżacji tego genu, było wątpliwe i przez dłuższy czas budziło liczne kontrowersje. W przedstawionych w literaturze, nielicznych przypadkach *CCND1*-negatywnych, dochodzi do nadekspresji cykliny D2 bądź D3. Jednak mechanizm prowadzący do patogenne zwiększenia aktywności genów *CCND2* i *CCND3* nie jest jasny. W niektórych przypadkach badanie FISH nie wykazuje translokacji ani amplifikacji w obrębie tych genów. W naszych badaniach potwierdzono aktywację *CCND2* w rezultacie jej przeniesienia w region *IGL*. Rearanżacje *CCND2*, opisane w nielicznych przypadkach MCL, wiązały się z fuzją *IGK/CCND2* [41, 45, 46]. Wykazana przez nas aberracja *IGL/CCND2* jest jak do tej pory unikalna, potwierdzając możliwość uzyskania fenotypu chłoniaka MCL przez nadmierne pobudzenie produkcji cykliny D2 wskutek transpozycji w region regulatora IG. Przeciwnie niż cyklina D1, cyklina D2 wykazuje aktywność w prawidłowych komórkach hematopoetycznych [47]. Można jednak wnioskować, że jej nadmierna ekspresja prowadzi, w określonych warunkach, do tych samych patogennych skutków, co ekspresja cykliny D1.

3.3. Zmienność w obszarze genów fuzyjnych

Zmienność w obszarze genu fuzyjnego badałam na modelu przewlekłej białaczki szpikowej. Cytogenetycznym markerem przewlekłej białaczki szpikowej jest wzajemna, zrównoważona translokacja t(9;22)(q34;q11), prowadząca do zaburzenia funkcjonowania genów *ABL* (9q34) i *BCR* (22q11). Badane przeze mnie spektrum zmienności obej-

muje tu: 1) zróżnicowanie w regionie fuzji *ABL/BCR* na zmienionym chromosomie 9 to jest obecność lub brak submikroskopowej delecji w obszarze fuzji i jej zakres oraz 2) zmienność punktów pęknięć w genach zaangażowanych w fuzję, która prowadzi do powstania różnego typu transkryptów *BCR/ABL* na zmienionym chromosomie 22.

3.3.1. Submikroskopowa delecja w obszarze genu fuzyjnego *ABL/BCR*

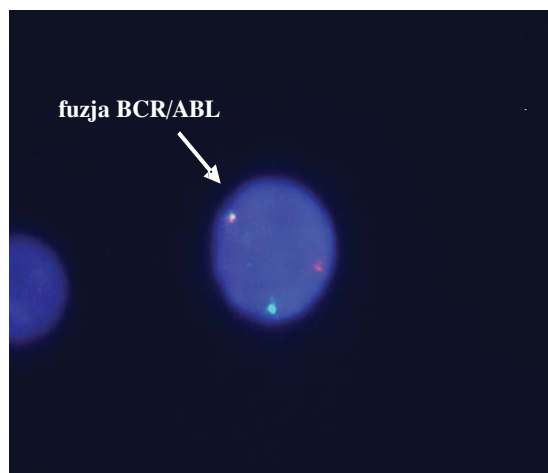
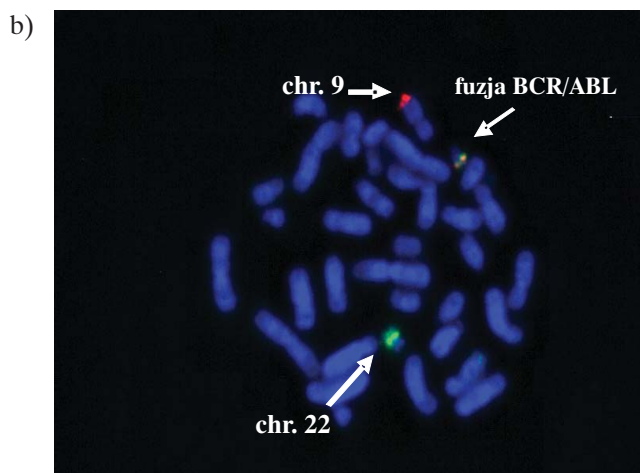
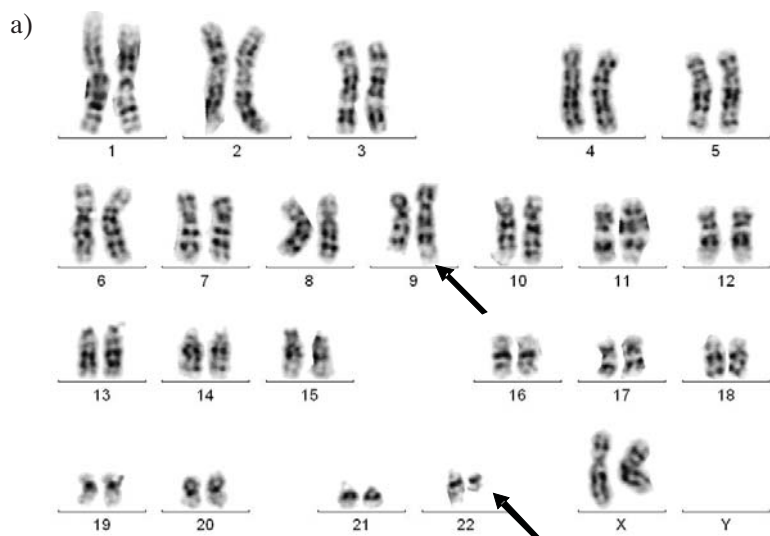
W 26 przypadkach białaczek badałam częstość i wzór submikroskopowej delecji obszaru fuzji *ABL/BCR*, która jest drugim, obok fuzji *BCR/ABL*, produktem translokacji t(9;22) [48]. Ze względu na brak jednoznacznego określenia obszaru ulegającego delecji, nierozwiązana pozostawała kwestia, czy analiza znakowania przeprowadzonego przy użyciu rutynowo stosowanej w diagnostyce sondy D-FISH *BCR/ABL* jest wystarczająco czułą metodą dla wykrycia takiej zmiany. Wykazałam obecność submikroskopowej delecji u 23% badanych pacjentów, z przewagą przypadków wykazujących utratę całego genu fuzyjnego *ABL/BCR* (Ryc. 2).

Potwierdziłam, że wykrycie submikroskopowej delecji w obszarze *ABL/BCR* jest możliwe w rutynowym badaniu FISH, przy użyciu sondy D-FISH, z równoległą analizą kariotypu.

Submikroskopowa delecja obszaru fuzyjnego *ABL/BCR* na zmienionym chromosomie 9 [der(9)] notowana jest, według danych literaturowych, u 10-30% chorych z CML [49]. W jej wyniku dochodzi do utraty części materiału genetycznego, zawierającego fragmenty jednego lub obu genów zaangażowanych w fuzję, oraz obszar genu *ASS* (*ASS1*, *argininosuccinate synthetase 1*), leżącego proksymalnie w stosunku do lokalizacji *ABL*. Wielkość delecji bywa różna i może wahać się od 120 kb do kilku 8 Mb, lokując się jednak poniżej poziomu detekcji klasycznej analizy prążkowej. Delecja obejmuje również sekwencje flankujące geny zaangażowane w translokację [50]. Wykazano, że delecja w regionie fuzji *ABL/BCR* powstaje równocześnie z zajęciem translokacji t(9;22), a więc jest ona cechą zmiany pierwotnej [51]. Delecja taka nie pojawia się w trakcie progresji, a częstość jej występowania nie zależy od stadium choroby.

W kolejnej mojej pracy przedstawiłam zależność pomiędzy obecnością submikroskopowej delecji w obszarze fuzji *ABL/BCR* a ewolucją kariotypu, w trakcie długotrwałego leczenia inhibitorem kinaz u 39 pacjentów [52]. Ocena ewolucji kariotypu w trzech grupach pacjentów, różniących się statusem delecji w obrębie fuzyjnego genu *ABL/BCR*, była prowadzona w ponad 5-letnim okresie obserwacji. Porównanie odpowiedzi cytogenetycznej, badanej technikami kariotypowania i FISH, pozwoliło na wykazanie częstszego występowania ewolucji kariotypu, w trakcie leczenia imatinibem, u pacjentów z delecją obszaru *ABL/BCR* (różnica istotna statystycznie).

Funkcja produktu fuzyjnego genu *ABL/BCR*, powstającego na zmienionym chromosomie 9 nie jest ostatecznie wyjaśniona, jednak uważa się, że jego znaczenie



Ryc. 2. Analiza cytogenetyczna pacjenta z przewlekłą białaczką szpikową

a) Kariotyp: 46,XX,t(9;22)(q34;q11)

b) Analiza FISH: Sonda D-FISH (Vysis): fuzja – Y, sygnał żółty; *ABL* – R, s. czerwony; *BCR* – G, s. zielony.

Wynik: znakowanie nietypowe (1R1G1Y), obecna fuzja *BCR/ABL* z równoczesną delecją *ABL/BCR*

w procesie karcinogenezy jest niewielkie. Udowodniono, że obecność submikroskopowej delecji w regionie fuzji *ABL/BCR*, obejmującej równocześnie gen *ASS*, jest jednak niezależnym czynnikiem złego rokowania u pacjentów leczonym interferonem alfa [53]. W ostatnich latach nastąpiło znaczne poprawienie rokowania w CML, ze względu na wprowadzenie terapii celowanej (imatinib, inhibitory kinazy tyrozynowej drugiej i trzeciej generacji). Ustalenie czynników ryzyka w leczeniu inhibitorami kinaz tyrozynowych jest nadal w trakcie badań. Nie podlega dyskusji rola niektórych mutacji punktowych w domenie kinazowej *BCR/ABL* oraz amplifikacji genu *BCR/ABL*, w pierwotnej bądź wtórnej oporności na terapię imatinibem [54-56]. Analiza przebiegu leczenia wskazuje jednak, że mechanizmy te nie wyczerpują przyczyn niepowodzenia leczenia, a w szczególności progresji zmian cytogenetycznych w klonie komórek Ph+ w trakcie leczenia inhibitorami kinaz. Wyniki moich badań w potwierdzają tezę, że choć submikroskopowa delecja w regionie fuzji *ABL/BCR* nie wpływa bezpośrednio na uzyskanie remisji cytogenetycznej w pierwszym okresie leczenia, to jed-

nak koreluje z pojawianiem się progresji choroby lub/i oporności wtórnej [52]. Zagadnienie wpływu delecji na rezultat leczenia inhibitorami kinaz jest nadal istotnym problemem. Daje temu wyraz zamieszczony równolegle komentarz redakcyjny, podkreślający konieczność dalszych ustaleń w tym zakresie [57].

3.3.2. Punkt pęknięcia w genie fuzyjnym *BCR/ABL*

W swoich badaniach wykazałam, że nietypowy punkt pęknięcia w genie fuzyjnym może modyfikować przebieg choroby [58]. U pacjenta z kompleksowym kariotypem i negatywnymi cechami rokowniczymi wykazano obecność rzadkiego transkryptu, będącego produktem genu *BCR/ABL* z punktami pęknięć w egzonie 13 genu *BCR* (b2) i egzonie 3 genu *ABL* (a3). Mimo obciążenia kariotypu powieleniem chromosomu Philadelphia (2~3 kopii) i chromosomu 8 (5~6 kopii) oraz submikroskopową delecją w regionie fuzji *ABL/BCR*, odpowiedź na leczenie imatinibem była bardzo dobra. Po pół roku uzyskano większą, a po roku całkowitą odpowiedź cyto-

genetyczną. Po dwóch latach leczenia całkowita remisja utrzymywała się zarówno na poziomie cytogenetycznym, jak i molekularnym.

Miejscami pęknięć w przypadku translokacji t(9;22) są: w chromosomie 9 region obejmujący gen *ABL* (prążek q34) i w chromosomie 22 region genu *BCR* (prążek q11). Punkt pęknięcia w obrębie genu *ABL* jest zmienny i może pojawić się w każdym miejscu obszaru obejmującego 300 kpz, często pomiędzy eksonami 1b i 1a. Natomiast gen *BCR* pęka w jednym z trzech regionów – M-bcr, m-bcr lub μ -bcr [56].

W ostatnich kilku latach pojawiły się doniesienia na temat różnic przebiegu CML, w zależności od miejsca złamania w obszarze M-bcr. Początkowo sądzono, że u pacjentów, u których stwierdza się transkrypt b2a2, choroba przebiega łagodniej (dłuższa faza przewlekła choroby, lepsza reakcja na interferon), niż u chorych z transkryptem b3a2 [59]. Późniejsze doniesienia wskazują na rolę egzonu a3-BCR w korzystnym rokowaniu [60], co zgodne jest z naszymi obserwacjami [52]. Molekularna identyfikacja produktu kluczowego genu fuzyjnego, w korelacji z danymi cytogenetycznymi i klinicznymi, może przybliżyć zrozumienie biologicznego znaczenia poszczególnych domen genów zaangażowanych w fuzyję.

3.4. Powielenie materiału 12p: i(12p) i aberracje substytutywne

W zebranej, unikalnej kolekcji zarodkowych guzów jąder, wyróżniłam dwa rodzaje aberracji, angażujących krótkie ramię chromosomu 12. Typowa zmiana to klasyczna aberracja i(12p). Rzadko, w miejsce typowego isochromosomu długiego ramienia chromosomu 12, występowało ukryte powielenie materiału 12p (*cryptic rearrangement*). W tych ostatnich powielenie kluczowego obszaru realizowane było na drodze duplikacji tandemowych lub powielenia materiału 12p w innych markerach, co wykazałam w kolejnych pracach [24, 26, 27]. Dzięki użyciu zaawansowanej techniki FISH z użyciem sond unikalnych wykazałam, że w markerach substytutowych, zastępujących i(12p), amplifikacji ulega wybiórczo region 12p11-13, zarówno w nasieniakach (*seminoma*), jak i nienasieniakach (*nonseminoma*). Powielenie obejmuje selektywnie dwa obszary: 12p11-12 oraz 12p13. Powielenie obszaru 12p11-13 jest w TGCT ważną cechą prognostyczną, związaną z wyższym stopniem zaawansowania guza.

Marker i(12p) jest rzeczywistym izochromosomem, a więc jego powstanie powoduje, obok powielenia materiału krótkiego ramienia (p) jednej z kopii chromosomu 12, równoczesną utratę jego długiego ramienia (q) [61]. Sugerowanym mechanizmem karcinogenezy jest tu amplifikacja materiału genetycznego w obszarze 12p11.2-12p12.1 [29]. Fenotyp nowotworowy komórek guza związany jest tu najprawdopodobniej z powieleniem panelu genów, zlokalizowanych w obszarze 12p, co potwierdzają współczesne badania technikami mikromacierzy CGH [62].

4. Znaczenie badań cytogenetycznych w praktyce klinicznej

Istotna część powtarzalnych aberracji kariotypowych, występujących w komórkach nowotworów, pełni rolę kryterium diagnostycznego lub wskaźnika rokowniczego. Bywają one też ważnym indykatorem przebiegu klinicznego choroby bądź odpowiedzi na określone leczenie. Światowa Organizacja Zdrowia wskazuje na zmiany genetyczne jako jedną z najważniejszych cech, pozwalających na klasyfikację poszczególnych nowotworów, szczególnie białaczek i chłoniaków [6]. Obecność typowej aberracji kariotypowej: wzajemnej translokacji, inwersji czy insercji jest wyrazem wczesnej lub pierwotnej zmiany, zaangażowanej w onkogenezę. Duża część tych zmian jest ściśle związana ze specyficznym typem nowotworu i ma kluczowe znaczenie diagnostyczne. Inne (np. utrata TP53, delecja 13q14) związane są z procesem progresji i występują w nowotworach różnych rodzajów, niejednokrotnie wpływając w sposób istotny na prognozę. Genetyczne zdefiniowanie choroby nowotworowej stało się w wielu przypadkach niezbędne, w związku z rozwojem nowej kategorii leczenia: terapii celowanej. Leczenie celowane można określić jako farmakologiczne oddziaływanie na cele cząsteczkowe, odgrywające zasadniczą rolę w powstawaniu i rozwoju danego nowotworu [63]. W idealnej sytuacji, wszystkie przypadki rozrostów hematologicznych, tak nowotworów złośliwych, jak i stanów przednowotworowych, powinny być poddane wnikliwej analizie cytogenetycznej. Niestety, z różnych względów, w tym finansowych, obecnie w Polsce nie zawsze jest to możliwe.

4.1. Chłoniaki nieziarnicze

Klasyfikacja nowotworów limfoproliferacyjnych stanowi najtrudniejsze wyzwanie współczesnej onkologii. Dobrym przykładem są trudności w diagnozie różnicowej w niektórych przypadkach chłoniaka Burkitta (BL), czy chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B (DLBCL). Z klinicznego punktu widzenia jest to poważny problem, bowiem leczenie w obu grupach tych chłoniaków różni się w sposób istotny [64]. Pacjenci z BL odpowiadają relatywnie słabo na leczenie standardowe dla DLBCL, zaś zastosowanie agresywnej, wysokodawkowej chemioterapii niemal zawsze prowadzi do wyleczenia, choć związane jest z dużym obciążeniem pacjenta.

Innym problemem jest zdefiniowanie nowo utworzonej grupy chłoniaków z pogranicza BL i DLBCL. Z grupy klasycznych BL wyłączone są przypadki, w których translokacja t(8;14) występuje w kariotypie kompleksowym. Także obecność translokacji t(14;18), z zaangażowaniem genu *BCL2* bądź obecność zaburzeń w obszarze 3q27 (gen *BCL6*), lub /i zaangażowanie genu *CCND1* (11q13), występujące równocześnie z rearanżacją *MYC* wyklucza rozpoznanie „prawdziwego” BL („*true*” BL), odpowiadając obrazowi chłoniaków podwójnego lub potrójnego uderzenia (*double-hit or triple-hit lymphomas*) [6, 65]. Wynika stąd konieczność stosowania metod precyzyjnego

różnicowania tych nowotworów z zastosowaniem technik cytogenetycznych, a uzyskane wyniki nierzadko bywają powodem korekty diagnozy [31].

Obecność translokacji t(11;14)(q13;q32) czy rearranżacji genu *CCND1* jest pomocna w odróżnieniu chłoniaka z komórek płaszczą od innych przewlekłych chłoniaków nieziarnicznych, takich jak chłoniak limfocytarny/przewlekła białaczka limfatyczna (SLL/CLL), chłoniak grudkowy (*follicular lymphoma* – FL), czy chłoniak strefy brzeżnej (*marginal zone lymphoma* – MZL) [66]. Równoległe użycie technik cytogenetyki klasycznej i molekularnej, towarzyszące badaniu techniką cytometrii przepływową, przyczyniło się do znacznego poprawienia jakości rozpoznania w tej grupie chłoniaków. Potwierdzenie udziału genów *CCND2* i *CCND3* umożliwia właściwą diagnozę w rzadkich przypadkach MCL, przebiegających bez zaangażowania genu cykliny D1.

4.2. Przewlekła białaczka szpikowa

Detekcja obecności translokacji t(9;22) z fuzją *BCR/ABL* jest warunkiem zdiagnozowania przewlekłej białaczki szpikowej oraz wdrożenia leczenia inhibitorami kinaz i monitorowania leczenia [67, 32]. Natomiast ta sama aberracja, występując w innych nowotworach jako zmiana wtórna, wskazuje na niekorzystną prognozę, jak to się dzieje u około 10-30% dorosłych pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL) [68].

Skuteczność leczenia pacjentów z CML inhibitorami kinaz jest zróżnicowana. Imatinib, podobnie jak inhibitory kinaz późniejszych generacji, jest znacznie mniej skuteczny w zaawansowanych stanach choroby (faza akceleracji i kryza blastyczna) niż u pacjentów w fazie przewlekłej CML [69, 70]. Leczenie takie pozwala jednak na uzyskanie odpowiedzi cytogenetycznej u ponad połowy pacjentów z niepowodzeniem wcześniejszego leczenia interferonem, aczkolwiek u znacznego odsetka chorych dochodzi do utraty odpowiedzi, co wykazaliśmy w badaniu grupy 60 pacjentów, obserwowanych w trakcie 4 letniego leczenia [71].

W momencie diagnozy nie obserwuje się różnic klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy pacjentami z obecnością i z brakiem submikroskopowych delecji w obszarze genu fuzyjnego *ABL/BCR*. Jednak wystąpienie tego typu aberracji było znaczącym czynnikiem prognostycznym w epoce przed zastosowaniem leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych. Rokowania dla chorych z delecją nie zależą od wieku, płci i procentowej zawartości blastów i płytek krwi. Jednak wszyscy pacjenci obciążeni tą zmianą wykazują dużo gorszą odpowiedź na leczenie interferonem α , skrócenie fazy przewlekłej i całkowitego czasu przeżycia, a także wcześniejsze nawroty po przeszczepie szpiku [53-55]. Znaczenie kliniczne tej zmiany w erze terapii celowanej jest nadal szeroko dyskutowane. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na istotnie wyższą częstość progresji zmian kariotypowych u pacjentów z delecją w regionie fuzji. W praktyce jest to wskazanie do zmiany cyklu monitorowania, po osiągnięciu całko-

witej remisji. U pacjentów z delecją kontrolne badania cytogenetyczne powinny być wykonywane co 6 miesięcy, częściej niż jest to zalecane u pacjentów bez czynników złego rokowania (co 1 rok) [32].

4.3. Zarodkowy guz jądra

W diagnostyce guzów litych badanie cytogenetyczne jest w większości przypadków techniką pomocniczą lub nie wchodzi w zakres rutynowych czynności diagnostycznych. Jednym z wyjątków jest określanie statusu *HER/NEU* w raku piersi, ważne dla wyboru strategii leczenia (terapia celowana). W wielu innych nowotworach próby określenia związku pomiędzy występowaniem określonej aberracji chromosomowej czy też rodzaju genu fuzyjnego, a szczegółową diagnozą czy rokowaniem klinicznym, są często w stadium wstępnych analiz.

Cytogenetyczne badanie nowotworów jąder także nie ma w większości przypadków znaczenia diagnostycznego, gdyż klasyczne techniki histopatologiczne są w pełni wystarczające dla określenia rozpoznania i klasyfikacji do podstawowych klas histopatologicznych. Badanie kariotypu pod kątem obecności i(12p) może być użyteczne w diagnostyce guzów o nieokreślonej histogenezie, takich jak nisko zróżnicowane nowotwory o nieznanym punkcie wyjścia (*poorly differentiated carcinoma of unknown primary site*). Ta heterogenna grupa zwiera obok nowotworów zarodkowych o pierwotnych lokalizacjach pozajądrowych (*extragonadal germ cell tumors*), także m.in. chłoniaki, czerniaki, czy rzadkie nerwiakonabłoniaki lub guzy desmoplazmatyczne. Obecność powielonych obszarów 12p potwierdza diagnozę zarodkowego guza jądra, a jej brak – ostatecznie wyklucza takie rozpoznanie.

Jako przykład diagnostycznej użyteczności badania cytogenetycznego w tym zakresie można przytoczyć przykład weryfikacji rozpoznania nasieniaka i ostateczne rozpoznanie chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B, u pacjenta z pierwotną lokalizacją nowotworu w jądrze. Weryfikacja rozpoznania została przeprowadzona w wyniku powtórnej analizy preparatów histologicznych, z dodatkowym barwieniem immunohistochemicznym, przeprowadzonym na skutek negatywnego wyniku badania cytogenetycznego w kierunku powielenia 12p [72]. Kolejny przykład to przeprowadzone przez nas potwierdzenie pochodzenia guza przerzutowego z pierwotnego TGCT, u pacjenta ze zmianami zlokalizowanymi w pęcherzu moczowym i żołądka [73]. W tych przypadkach ustalenie rozpoznania było kluczowe dla podjęcia właściwej terapii opartej na cisplatinie.

Wśród czynników prognostycznych w grupie nowotworów zarodkowych jądra, decydujących o prawdopodobieństwie długiego przeżycia, są: wymiary i lokalizacja pierwotnego guza, obecność/brak przerzutów, rodzaj utkania guza, początkowy poziom biochemicznych markerów nowotworowych, stopień zaawansowania. Określenie stopnia powielenia 12p, choć uzyskało potwierdzenie statusu czynnika rokowniczo istotnego, w codziennej praktyce klinicznej ma nadal znaczenie marginalne. Badanie kariotypowe, ze względu na poliploidalny cha-

rakter komórek guza i na wspomniane wcześniej przeszkody techniczne, jest w tym przypadku zbyt trudne do wykonania i interpretacji jako badanie rutynowe. Wykorzystanie markerów cytogenetycznych w rutynowej ocenie guzów TGCT będzie możliwe dopiero po opracowaniu prostych testów, opartych na technice FISH, z ustaleniem restrykcyjnych warunków kontrolnych dla uniknięcia wyników fałszywie pozytywnych.

Dr n. med. Barbara Pieńkowska-Grela
Samodzielna Pracownia Cytogenetyki
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

5. Piśmiennictwo

- Włodarska I. W: Krzakowski M (red.). *Onkologia kliniczna*. Warszawa: Borgis, Wydawnictwo Medyczne; 2001, 202-228.
- Siedlecki JA, Limon J. W: Bał J. (red.) *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Warszawa: PWN; 2006, 336-417.
- <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497.
- Zech L, Haglund U, Nilsson K. i wsp.. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL i wsp. (red.). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 2008, 265-266.
- Macintyre E, Willerford D, Morris SW. Non-Hodgkin's lymphoma: molecular features of B cell lymphoma. *Hematology*. <http://www.asheducationbook.org>; 2000; 180-204.
- Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 495-519.
- Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3707-21.
- Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A i wsp. Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* 1982; 298: 474-6.
- <http://atlasgeneticsoncology.org/>
- Vandenbergh E, De Wolf-Peters C, van den Oord J i wsp. Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle center cell lineage. *J Pathol* 1991; 163: 13-18
- Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J i wsp. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 1985; 315: 340-3.
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B i wsp. Human D-type cyclin. *Cell* 1991; 65: 691-9.
- Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB i wsp. Cyklin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J* 1994 13: 3487-95.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
- Heisterkamp N, Groffen J. Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol Pathol* 1991; 5: 1-10.
- Mandahl N, Mertens F, Mitelman F. Genetic changes in bone and soft tissue tumors. *Acta Orthop Scand* 1999; 70: 30-40.
- Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Translocations involving the X chromosome in solid tumors: Presentation of two sarcomas with t(X;18)(q13;p11). *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 87-91.
- Boultonwood J, Lewis S, Wainscoat JS. The 5q- syndrome. *Blood* 1994; 99: 4638-41.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M i wsp. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224: 1121-4.
- Atkin NB, Baker MC. i(12p). Specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* 1983; 10: 199-204.
- Rodriguez E, Mathew S, Router V i wsp. Cytogenetic analysis of 124 prospectively ascertained male germ cell tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 2285-91.
- Pieńkowska B, Grygalewicz B, Witkowska A. Analiza występowania izochromosomu i(12p) w ludzkich guzach jąder przy zastosowaniu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ. *Gin Pol* 1997; 86: 274-51.
- Castedo SM, de Jong, Oosterhuis W i wsp. Chromosomal changes in human primary testicular nonseminomatous germ cell tumors. *Cancer Res* 1989; 49: 5696-701.
- Pienkowska-Grela B, Grygalewicz B, Bregula U. Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 in seminoma and nonseminoma groups of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 134: 102-8.
- Grygalewicz B, Pieńkowska-Grela B, Woroniecka R. Cryptic rearrangements of chromosome 12 in testicular germ cell tumors with or without the specific i(12p) marker. *J Appl Genet* 2000; 41: 123-31.
- Mostert MC, Verkerk AJ. Identification of the critical region of lip overrepresentation in TGCT of adolescent and adults. *Oncogene* 1998; 16: 2617-27.
- Paternoster SF, Brockman SR, McClure RF i wsp. A new method to extract nuclei from paraffin embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 2002; 160: 1967-72.
- <http://genome.ucsc.edu/>, <http://www.ensembl.org/>.
- Gałązka K, Mioduszewska O, Maryniak R i wsp. Podstawowe zasady i organizacja diagnostyki patologicznej chłoniaków. *Polish J Pathol* 2007; 58: 1-14.
- Prejzner W, Sacha T, Salamanczuk Z i wsp. Standard postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych z przewlekłą białaczką szpikową w Polsce w roku 2007. *Acta Hematologica Polonica* 2007; 30: 107-22.
- Pienkowska-Grela B, Witkowska A, Grygalewicz B i wsp. Frequent aberrations of chromosome 8 in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 156: 114-21.
- Nesbit CE, Tresak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999; 18: 3004-16.
- Asasaka T, Asasaka H, Ueda C i wsp. Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with c-myc/immunoglobulin heavy-chain fusion. *J Clin Oncol* 2000; 18: 510-8.
- Pienkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Grygalewicz B i wsp. Partial trisomy 11 – dup(11)(q23q13) – as a defect characterizing lymphomas with Burkitt lymphoma pathomorphology without MYC gene rearrangement. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2009, w druku.
- http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxa_11.
- Bartel DP. MicroRNAs. genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
- Leucci E, Cocco M, Onnis A i wsp. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* 2008; 216: 440-50.
- Zajdel M, Rymkiewicz G, Pienkowska-Grela B i wsp. MicroRNAs as potential biomarkers in the differential diagnosis of Burkitt's lymphoma vs diffuse large B-cell lymphoma. W: *Abstract Book*, 4th International qPCR Symposium Diagnostics & Molecular Markers, 9-13 March, 2009, Freising-Weihenstephan, Germany, s. 53.
- Włodarska I, Meeus P, Stul M i wsp. Wariant t(2;11)(p11;q13) associated with the IgK-CCND1 rearrangement is a recurrent translocation in leukemic small-cell B-non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2004; 18: 1705-10.
- Woroniecka R, Grygalewicz B, Pienkowska-Grela B i wsp. Variant t(2;11)(p11.2;q13) without IGK involvement in a case of mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 175: 154-8.
- Huber C, Tiebe R, Hameister H i wsp. A human immunoglobulin kappa orthon without sequence defects may be the product of pericentric inversion. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3475-8.
- Liu H, Wang J, Epner EM. Cyclin D1 activation in B-cell malignancy: association with changes in histone acetylation, DNA methylation, and RNA polymerase II binding to both promoter and distal sequences. *Blood* 2004; 104: 2505-13.
- Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI i wsp. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006; 108: 1109-10.
- Włodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V i wsp. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14) – negative mantle cell lymphomas. *Blood* 2008; 111: 5683-90.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC i wsp. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005; 106: 4315-21.
- Pieńkowska-Grela B, Woroniecka R, Dorozuk K i wsp. Częstość delekcji submikroskopowego obszaru fuzji ABL/BCR w badaniu rutynowym i przy

- użyciu sond specyficznych u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. *Acta Haematologica Polonica* 2008; 39: 99-110.
49. Kolmietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S i wsp. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 2001; 97: 3581-8.
 50. Zagaria A, Anelli L, Albano F i wsp. Molecular cytogenetic characterization on der(9) in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 167: 97-102.
 51. Huntly BJP, Reid AG, Bench AJ i wsp. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1732-8.
 52. Pięnkowska-Grela B, Rygiel J, Woroniecka R i wsp. Karyotype changes during long-term targeted therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib. *Leukemia and Lymphoma* 2009; 50: 952-65.
 53. Cohen N, Rozenfeld-Granot G, Hardan I i wsp. Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 128: 114-119.
 54. Jabbour E, Kantarjian HM, Jones D i wsp. Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with F317L BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2008; 112: 4839-42.
 55. Zaccaria A, Valenti AM, Danti E, Gozzetti A, Ronconi S, Spedicato F i wsp. Persistence of chromosomal abnormalities additional to the Philadelphia chromosome after Philadelphia chromosome disappearance during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 564-565.
 56. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K i wsp. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-880.
 57. Godley LA. Deletion of the der(9q) chromosome in chronic myeloid leukemia: the controversy continues. *Leuk Lymph* 2009; 50: 871-2.
 58. Pięnkowska-Grela B, Woroniecka R, Solarska I i wsp. Complete cytogenetic and molecular response after imatinib treatment for chronic myeloid leukaemia in a patient with atypical karyotype and BCR-ABL b2a3 transcript. *Cancer Genetic Cytogenetic* 2007; 174: 111-5.
 59. Iwata S, Mizutani S, Nakazawa S i wsp. Heterogeneity of the breakpoint in the ABL gene in cases with BCR/ABL transcript lacking ABL exon a2. *Leukemia* 1994; 8: 1696-702.
 60. Liu Li-Gen, Tanaka Hideo, Ito Kinro i wsp. Chronic myelogenous leukemia with e13a3 (b2a3) type of BCR-ABL transcript having a DNA breakpoint between ABL exons a2 and a3. *Am J Hematol* 2003; 74: 268-72.
 61. Peltomaki P, Lothe RA, Borresen AL i wsp. Chromosome 12 in human testicular cancer: Dosage changes and their parental origin. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 64: 21-6.
 62. Skotheim RI, Autio R, Lind GE i wsp. Novel genomic aberrations in testicular germ cell tumors by array-CGH, and associated gene expression changes. *Cell Oncol* 2006; 28: 315-26.
 63. Jędrzejczak WW. Co nowego w diagnostyce i terapii w hematologii i onkologii hematologicznej? *Przew Lek* 2009; 1: 118-25.
 64. Bishop PC, Rao VK, Wilson WH. Burkitt's lymphoma: molecular pathogenesis and treatment. *Cancer Invest* 2000; 18: 574-83.
 65. Boerma EG, Siebert R, Kluin PM i wsp. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia* 2009; 23: 225-34.
 66. Rymkiewicz G, Ptaszynski K, Walewski J i wsp. Unusual cyclin D1 Positive Marginal Zone Lymphoma of Mediastinum. *Med Oncol* 2006; 23: 423-8.
 67. Hehlman R, Hochhaus A, Baccarani M. On behalf of the European LeukemiaNet. Chronic Myeloid Leukemia. *The Lancet* 2007; 370: 342-50.
 68. Bentz M, Cabot G, Moos M i wsp. Detection of chimeric myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. *Blood* 1994; 83: 1922-8.
 69. Baccarani M, Saglio G, Goldman J i wsp. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809-20.
 70. Drucker BJ, Guilhot F, O'Brien SG i wsp. Five-year follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic-phase shows sustained responses and high overall survival. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408-17.
 71. Holowiecki J, Konopka L, Bober G i wsp. A study to determine the safety and efficacy of imatinib mesylate in patients with chronic phase of chronic myeloid leukemia after interferon therapy failure. Four year follow-up. *Pol Archiw Med Wewn* 2006; 1156: 535-44.
 72. Grygalewicz B, Woroniecka R, Pięnkowska-Grela B i wsp. Wartość diagnostyczna oceny cytogenetycznej – przypadek chłoniaka z dużych rozlanych komórek B (DLBCL). *Wsp Onkol* 2002; 5: 308-11.
 73. Korski K, Breborowicz D, Filas V i wsp. A case of primary testicular germ cell tumor with rhabdomyosarcoma metastases as an example of applying the FISH method to diagnostic pathology. *APMIS* 2007; 115: 1296-301.

6. Publikacje z badań własnych związane z tematem artykułu i przedstawione jako rozprawa habilitacyjna

1. Pięnkowska-Grela B, Grygalewicz B, Bregula U. Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 in seminoma and nonseminoma groups of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 134: 102-8.
2. Grygalewicz B, Pięnkowska-Grela B, Woroniecka R. Cryptic rearrangements of chromosome 12 in testicular germ cell tumors with or without the specific i(12p) marker. *J Appl Genet* 2000; 41: 123-31.
3. Gałązka K, Mioduszewska O, Maryniak R, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Rymkiewicz G, Pięnkowska-Grela B, Gruchala A, Rudzki Z, Stachura J. Podstawowe zasady i organizacja diagnostyki patologicznej chłoniaków. *Polish J Pathol* 2007; 58: 1-14
4. Prejzner W, Sacha T, Salamanczuk Z, Pięnkowska-Grela B, Haus O, Hellmann A. Standard postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych z przewlekłą białaczką szpikową w Polsce w roku 2007. *Acta Haematologica Polonica* 2007; 30: 107-22.
5. Pięnkowska-Grela B, Witkowska A, Grygalewicz B, Rymkiewicz G, Rygiel J, Woroniecka R, Walewski J. W Frequent aberrations of chromosome 8 in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 156: 114-21.
6. Woroniecka R, Grygalewicz B, Pięnkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Konecki R, Swoboda P, Janik P. Variant t(2;11)(p11.2;q13) without IGK involvement in a case of mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 175: 154-8.
7. Pięnkowska-Grela B, Woroniecka R, Doroszuk K, Rygiel J, Pastwińska A, Grygalewicz B, Prejzner W, Hellmann A. Częstość delecji submikroskopowego obszaru fuzji ABL/BCR w badaniu rutynowym i przy użyciu sond specyficznych u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. *Acta Haematologica Polonica* 2008; 39: 99-110.
8. Pięnkowska-Grela B, Rygiel J, Woroniecka R, Grygalewicz B, Pastwińska A, Krawczyk P, Ceglarek B, Seferyńska I, Sikorska A, Konopka L. Karyotype changes during long-term targeted therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib. *Leukemia and Lymphoma* 2009; 50: 952-65.
9. Pięnkowska-Grela B, Woroniecka R, Solarska I, Kos K, Pastwińska A, Konopka L, Majewski M. Complete cytogenetic and molecular response after imatinib treatment for chronic myeloid leukaemia in a patient with atypical karyotype and BCR-ABL b2a3 transcript. *Cancer Genetic Cytogenetic* 2007; 174: 111-5.
10. Rymkiewicz G, Ptaszynski K, Walewski J, Blachnio K, Swoboda P, Gos M, Paszkiewicz-Kozik R, Pięnkowska-Grela B, Czarnocka M, Janik P. Unusual cyclin D1 Positive Marginal Zone Lymphoma of Mediastinum. *Med Oncol* 2006; 23: 423-8.
11. Holowiecki J, Konopka L, Bober G, Giebel S, Ceglarek B, Kos K, Stella-Holowiecka B, Kruzel T, Kopera M, Bartkowska-Chrobok A, Pszena E, Sikorska A, Pięnkowska-Grela B. A study to determine the safety and efficacy of imatinib mesylate in patients with chronic phase of chronic myeloid leukemia after interferon therapy failure. Four year follow-up. *Pol Arch Med Wewn* 2006; 115: 6:535-44.
12. Grygalewicz B, Woroniecka R, Pięnkowska-Grela B, Sikora K. Wartość diagnostyczna oceny cytogenetycznej – przypadek chłoniaka z dużych rozlanych komórek B (DLBCL). *Współ Onkol* 2002; 5: 308-11.
13. Korski K, Breborowicz D, Filas V, Breborowicz J, Grygalewicz B, Pięnkowska-Grela B. A case of primary testicular germ cell tumor with rhabdomyosarcoma metastases as an example of applying the FISH method to diagnostic pathology. *APMIS* 2007; 115: 1296-301.
14. Pięnkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Woroniecka R, Krawczyk P, Czyż-Domanska K, Walewski J. Partial trisomy 11 – dup(11)(q23q13) – as a defect characterizing lymphomas with Burkitt lymphoma pathomorphology without MYC gene rearrangement. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2009, w druku.

Otrzymano i przyjęto do druku: 27 sierpnia 2009 r.