

ZAŁĄCZNIK NR 3

Autoreferat

Dr n. med. Beata Grygalewicz

Samodzielna Pracownia Cytogenetyki

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –

Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Warszawa 2021

Spis Treści

1. Imię i nazwisko.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
4. Omówienie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 pkt. 2b Ustawy.....	3
4.1. Cykl publikacji pod tytułem:.....	3
Cytogenetyczna charakterystyka nowej jednostki WHO 2017 „Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q” implikacje diagnostyczno-kliniczne.....	3
Wprowadzenie.....	4
Techniki badań cytogenetycznych.....	5
Badania cytogenetyczne w hematologii.....	7
Chłoniak Burkitt’a.....	7
Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q.....	11
Cel badań.....	12
Materiał i metody badawcze.....	12
Opis wyników i dyskusja.....	13
Wnioski wynikające z Osiągnięcia Naukowego.....	22
Użyteczność kliniczna badań własnych.....	23
4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	24
Badania cytogenetyczne z zarodkowych guzów jądra i jajnika.....	24
Badania cytogenetyczne w nowotworach hematologicznych.....	26
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną.....	29
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	31
6.1. Działalność dydaktyczna.....	31
6.2. Działalność organizacyjna.....	32
6.3. Wykłady na zaproszenie.....	32
6.4. Popularyzowanie nauki w zakresie hematologii.....	33
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	34
7.1. Kierowanie projektami grantowymi.....	34
7.2. Nagrody i wyróżnienia.....	35
7.3. Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	35
7.4. Recenzje prac naukowych.....	35
8. Udział w badaniach klinicznych w zakresie oceny cytogenetycznej.....	36
9. Konsultacje.....	36
Literatura.....	37

1. Imię i Nazwisko

Beata Grygalewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne - z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 21.12.1995 uzyskanie dyplomu magistra biologii po odbyciu studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w latach 1990-1995.
- 30.06.2003 uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna uchwałą Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pod tytułem „Określenie regionów amplifikacji krótkiego ramienia chromosomu 12 w guzach jądra człowieka”, promotor prof. Janusz Siedlecki
- 15.10.2003 uzyskanie tytułu diagnosty laboratoryjnego uchwałą Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych w dziedzinie genetyka medyczna
- 17.11.2006 uzyskanie tytułu specjalisty w dziedzinie laboratoryjnej genetyki medycznej po złożeniu Państwowego Egzaminu Specjalizacyjnego Diagnostów Laboratoryjnych.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1995-1999 Specjalista Biolog, Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa
- 1999-2004 Asystent naukowy, Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa
- 2004 – 2019 Adiunkt, Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa
- 2019 - Kierownik Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

4. Omówienie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 pkt. 2b Ustawy

4.1 Cykl publikacji pod tytułem:

Cytogenetyczna charakterystyka nowej jednostki WHO 2017 „Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q” - implikacje diagnostyczno-kliniczne,
stanowiący podstawę habilitacji:

1. Pienkowska-Grela B, Rymkiewicz G, ***Grygalewicz B**, Woroniecka R, Krawczyk P, Czyż-Domanska K, Walewski J (2011). **Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without MYC gene rearrangement.** Med Oncol 2011 Dec;28(4):1589-95. doi: 10.1007/s12032-010-9614-0. Epub 2010 Jul 27.

***Współautor; IF= 2,140; pkt MNiSW= 20**

2. ***Grygalewicz B**, Woroniecka R, Rymkiewicz G, Rygier J, Borkowska K, Kotyl A, Blachnio K, Bystydziński Z, Nowakowska B, Pienkowska-Grela. **The 11q-Gain/Loss Aberration Occurs Recurrently in MYC-Negative Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration, as Well as MYC-Positive Burkitt Lymphoma and MYC-Positive High-Grade B-Cell Lymphoma, NOS.** Am J Clin Pathol. 2017 Dec 20;149(1):17-28. doi: 10.1093/ajcp/ aqx139.

***Główny badacz i korespondencyjny autor; IF= 1,962; pkt MNiSW= 35**

3. ***Grygalewicz B**, Woroniecka R, Rymkiewicz G, Rygier J, Malawska N, Blachnio K, Bystydziński Z, Borysiuk A, Nowakowska B, Pienkowska-Grela B. **Genetic progression of post-transplant Burkitt-like lymphoma case with 11q-Gain/Loss and MYC amplification.** Cancer Genet. 2020 Jul;245:1-5. doi: 10.1016/j.cancergen. 2020.05.001. Epub 2020 May 18.

***Główny badacz i korespondencyjny autor; IF= 3,105; pkt MNiSW= 70**

4. Rymkiewicz G, ***Grygalewicz B**, Chechlińska M, Blachnio K, Bystydziński Z, Romejko-Jarosinska J, Woroniecka R, Zajdel M, Domanska-Czyż K, Martin-Garcia D, Nadeu F, Swoboda P, Rygier J, Pienkowska-Grela B, Siwicki JK, Prochorec-Sobieszek M, Salaverria I, Siebert R, Walewski J. **A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration.** Mod Pathol. 2018 May;31(5):732-743. doi: 10.1038/modpathol.2017.186. Epub 2018 Jan 12.

***Współautor; IF= 6,19; pkt MNiSW= 45**

5. **Beata Grygalewicz. Metody cytogenetyki molekularnej w różnicowaniu agresywnych B-NHL.** Acta Haematologica Polonica, 2019,50: 109-115 DOI: <https://doi.org/10.2478/ahp-2019-0018>

***Główny i korespondencyjny autor; IF= 0; pkt MNiSW= 20**

Łączny IF cyklu stanowiącego podstawę habilitacji wynosi 13,572 (MNiSW = 190)

Załącznik 5 - Kopia cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących podstawę habilitacji.

Załącznik 6 - Oświadczenia habilitanta oraz współautorów wskazujące na merytoryczny wkład w powstanie publikacji.

Wprowadzenie

Cytogenetyczne zmiany chromosomowe są to zaburzenia, wykrywane w komórkach nowotworów na poziomie morfologii chromosomu (cytogenetyka klasyczna) lub statusu genu (cytogenetyka molekularna), wskazujące na wystąpienie nieprawidłowości genetycznych w regionie zmiany. W określonym typie nowotworu aberracje takie mogą wskazywać przyczynową zmianę patognomoniczną (zamiana pierwotna) lub zaburzenia pojawiające się w trakcie progresji nowotworu (zmiany wtórne).

Klasyczne badanie cytogenetyczne w rozrostach limfoidalnych polega na analizie liczbowej i strukturalnej barwionych różnicowo chromosomów metafazowych, uzyskanych ze zmienionej nowotworowo tkanki węzła chłonnego, guza ewentualnie zajętego szpiku lub krwi, poddawanych specjalistycznej analizie mikroskopowej. Prawidłowy kariotyp człowieka składa się 46 chromosomów: 22 par autosomów i pary chromosomów płci XX lub XY. W komórkach nowotworowych dochodzi do odstępstw od tego wzorca. Wiele nowotworów limfoidalnych wykazuje obecność charakterystycznych aberracji, definiujących chorobę.

Wśród zmian liczbowych występują utraty chromosomów czyli monosomie lub ich dodatkowe kopie czyli trisomie lub tetrasomie. Zmiany te mogą mieć znaczenie prognostyczne. Przykładowo monosomia 7 w ostrej białaczce szpikowej (AML – *Acute Myeloid Leukemia*) wskazuje na złą prognozę, natomiast trisomia 12 w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL – *Chronic Lymphocytic Leukemia*) związana jest z pośrednim rokowaniem i dobrą odpowiedzią na terapię.

Przykładami aberracji strukturalnych chromosomów są translokacje, amplifikacje, delecje czy inwersje. Translokacje prowadzą do wymiany fragmentów pomiędzy chromosomami czego efektem może być powstanie w miejscach złamań genów fuzyjnych o właściwościach onkogennych. Zjawisko takie ma miejsce w białaczkach. Klasycznym przykładem opisywanego mechanizmu jest translokacja t(9;22)(q34;q11.2) w przewlekłej białaczce szpikowej (CML - *Chronic Myeloid Leukemia*) prowadząca do powstania genu

fuzyjnego *BCR/ABL1*, kodującego białko o właściwościach konstytutywnie aktywnej kinazy tyrozynowej, co prowadzi do transformacji nowotworowej komórki macierzystej szpiku.

Innym mechanizmem aktywacji onkogenu na drodze translokacji jest przeniesienie jego części kodującej w sąsiedztwo silnego promotora, co prowadzi do nadekspresji.

Podobny mechanizm występuje często w chłoniakach B-komórkowych, w których onkogeny *MYC*, *CCND1*, *BCL2* czy *BCL6* w wyniku translokacji zostają przeniesione pod wpływ silnych promotorów genów, kodujących łańcuchy immunoglobulin. W chłoniakach i ostrych białaczkach T-komórkowych onkogeny takie jak *TLX1*, *TLX3*, *TAL1*, *TAL2*, *LMO2* przenoszone są pod wpływ promotorów genów *TCR* (*TCR - T-cell receptor*).

Kolejnymi, charakterystycznymi dla nowotworów, zmianami cytogenetycznymi są amplifikacje onkogenów od 5 do nawet kilkuset kopii, które prowadzą do nadprodukcji kodowanego przez nie białka, co funkcjonalnie może mieć efekt podobny do translokacji. Na poziomie kariotypu amplifikacje mają postać homogenicznie barwiących się regionów chromosomowych (HSR – *Homogeneously Staining Region*) lub struktur poza chromosomowych w formie drobnych, podwójnych fragmentów DNA (DM - *Double Minute Chromosomes*). Przykładem amplifikacji w komórkach nowotworowych może być onkogen *HER2* w raku piersi lub *MYC* w ostrej białaczce szpikowej.

Delecje w komórkach nowotworowych dotyczą często genów supresorowych, najczęściej inaktywacji ulegają oba allele genu, co istotnie przyczynia się do procesu kancerogenezy i wiąże się z progresją choroby i pogorszeniem rokowania. W CLL u większości pacjentów z delecją genu supresorowego *TP53* dochodzi do mutacji w drugiej kopii genu.

Kolejną zmianą strukturalną jest inwersja, która jest efektem wystąpienia dwóch punktów pęknięć na jednym chromosomie i odwróceniu fragmentu znajdującego się pomiędzy nimi. Taką zmianą jest inwersja 16: *inv(16)(p13q22)* prowadząca do fuzji genów *CBFB-MYH11* w AML. Zmiana ta związana jest z dobrym rokowaniem, lepszym nawet niż u pacjentów z prawidłowym kariotypem.

Techniki badań cytogenetycznych

Istnieje szereg technik, stosowanych w analizie cytogenetycznej, pozwalających na wykrywanie i ocenę powyższych aberracji. Metoda cytogenetyki klasycznej, czyli mikroskopowe badanie kariotypowe, pozwala na ocenę ilościową i jakościową wszystkich chromosomów w komórce, analizowanych w metafazie podziału komórkowego. Zaletą tej

techniki jest możliwość równoczesnej oceny całościowego obrazu zmian genetycznych w komórce. Przy analizie większej liczby metafaz można określić klonalność aberracji. Wadami tej metody są stosunkowo mała rozdzielczość (5-10 Mbp) i konieczność uzyskania podziałów mitotycznych badanych komórek nowotworu. Ocena możliwa jest tylko na materiale żywych, dzielących się, komórek czyli niezbędna jest hodowla komórkowa *in vitro*, a wiarygodność wyniku zależy od doświadczenia cytogenetyka. Z czasem klasyczna metoda kariotypowa została uzupełniona o komplementarne techniki molekularne, które zapewniły wyższą rozdzielczość badania. Wśród molekularnych metod cytogenetycznych można wyróżnić: fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization*), porównawczą hybrydyzację genomową na bazie mikromacierzy (aCGH – *array Comparative Genomic Hybridization*) oraz mikromacierzowe badanie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (aSNP – *array Single Nucleotide Polymorphism*) .

W porównaniu do analizy kariotypowej badanie FISH oferuje większą rozdzielczość (do 3 Mbp), umożliwiając wykrycie submikroskopowych aberracji chromosomowych. Metoda ta pozwala na szybką analizę setek komórek, również nie dzielących się lub zatopionych w blockach parafinowych. Daje ona możliwość identyfikacji trisomii, monosomii, translokacji, amplifikacji genów, delecji, insercji, inwersji, addycji oraz chromosomów markerowych. Wadą techniki FISH jest brak możliwości równoczesnej analizy całego kariotypu, a badanie ograniczone jest do obszarów genomu lub genów zdefiniowanych przez użyte sondy DNA.

Kolejna metoda aCGH, nazywana „kariotypem molekularnym”, pozwala na jednoczesną ocenę wielu tysięcy genów podczas jednej hybrydyzacji. Metoda ta polega na hybrydyzacji, wyznakowanych w różnych kolorach, badanego (nowotworowego) i referencyjnego (prawidłowego) DNA do mikromacierzy, czyli sond molekularnych naniesionych na szkiełko podstawowe. Wynik badania otrzymany jest przez pomiar stosunku intensywności fluorescencji obu fluorochromów, którymi wyznakowany jest DNA badany i referencyjny. Pomiar stosunku intensywności sygnałów dokonywany jest przez laser skanera do mikromacierzy o wysokiej rozdzielczości. Analiza wyników przeprowadzana jest za pomocą specjalistycznego oprogramowania komputerowego. Metoda aCGH umożliwia badanie całego genomu a jej rozdzielczość zależy od liczby i wyboru sond na szkiełku. Do analizy aCGH nie jest wymagana hodowla *in vitro* komórek pacjenta. Technika ta ma swoje ograniczenia, nie wykrywa bowiem aberracji zrównoważonych takich jak translokacje, inwersje czy insercje oraz nie wykrywa zmian w ploidii komórek.

Mikromacierze SNP wykorzystuje się do identyfikacji występujących w komórkach nowotworowych obszarów utraty heterozygotyczności (LOH - *Loss of Heterozygosity*), które powstają w skutek delecji części materiału genetycznego, co w konsekwencji powoduje występowanie w komórce tylko jednego allelu danego genu. Mikromacierze SNP wykorzystywane są również do wykrywania innych aberracji genetycznych, takich jak aneuploidia, trisomia czy disomia jednorodzicielska (UPD - *Uniparental disomy*). Mechanizm UPD służy do eliminacji jednej kopii fragmentu DNA i zastąpienia jej powieloną, pozostałą kopią, zwykle ze zmutowanymi lub recesywnymi genami. Nabyta disomia jednorodzicielska jest dosyć częsta w nowotworach hematologicznych jak i w guzach litych i stanowi od 20% do 80% utrat heterozygotyczności występujących w nowotworach ludzkich (Gondek i wsp., 2008, Beroukhim i wsp., 2006). Podobnie jak w przypadku aCGH mikromacierze SNP nie wykrywają zmian zrównoważonych.

Badania cytogenetyczne w hematologii

Badania cytogenetyczne, w szeroko pojętej hematologii onkologicznej, służą do identyfikacji chromosomowych markerów chorób nowotworowych, dzięki którym możliwe jest jednoznaczne diagnozowanie nowotworów hematologicznych, prognozowanie przebiegu choroby, wybór optymalnej terapii oraz monitorowanie przebiegu leczenia. Z tych powodów badania cytogenetyczne są jednym z podstawowych badań w diagnostyce białaczek i chłoniaków, a o ich istotności świadczy ujęcie zmian cytogenetycznych w klasyfikacji nowotworów mieloidalnych i limfoidalnych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO - *World Health Organization*). Klasyfikacja WHO stanowi podstawę podziału na poszczególne jednostki histokliniczne z uwzględnieniem cech morfologicznych, immunofenotypowych, cytogenetycznych, genetycznych i innych biologicznych oraz obrazu klinicznego. Dzięki temu stanowi ona algorytm dla lekarza klinicysty, patologa oraz diagnosty i pozwala na precyzyjne ustalenie rozpoznania u chorych z podejrzeniem nowotworów hematologicznych.

Chłoniak Burkitt'a

Klasycznym przykładem zmian cytogenetycznych definiujących rozpoznanie chłoniaka jest agresywny chłoniak Burkitt'a (BL – *Burkitt lymphoma*), w którym dochodzi do rearanżacji onkogenu *MYC* (8q24), aberracji będącej tu zmianą pierwotną, występującą w karyotypie prostym. Translokacja *MYC*, mimo iż wysoce charakterystyczna dla BL, nie jest swoista dla tej

choroby. Z różną częstością zmiana ta notowana jest w innych chłoniakach, stanowiąc zwykle źle rokująca zmianę wtórną. Do rearanżacji genu *MYC* najczęściej dochodzi na drodze translokacji t(8;14)(q24;q32), przenoszącej gen *MYC* w region łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGH - Immunoglobulin Heavy Locus*), zlokalizowanego na chromosomie 14 (14q32). Rzadziej, czyli w około 5-10% przypadków, geny łańcuchów lekkich: kappa (*IGK - Immunoglobulin Kappa Locus*, 2p11.2) na chromosomie 2 lub lambda (*IGL - Immunoglobulin Lambda Locus*, 22q11.22) na chromosomie 22, są przenoszone do locus *MYC*, odpowiednio jako translokacje t(2;8)(p11.2;q24) i t(8;22)(q24;q11.2). Efekt wszystkich trzech translokacji jest ten sam. Następuje nadekspresja genu *MYC* w komórce obciążonej zmianą, powodując wysoki poziom kumulacji białka *MYC*, będącego kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek.

W chłoniaku Burkitt'a aberracja obejmująca locus *MYC* jest często jedynym zaburzeniem cytogenetycznym. Kariotyp BL jest przeważnie prosty, czyli rearanżacji *MYC* towarzyszą co najwyżej dwie inne aberracje chromosomowe. Najczęstszymi zmianami wtórnymi są: duplikacje 1q21-25, delecje 6q11-14, 13q32-34, 17p oraz trisomie 12, 7, 8 i 18. Pacjenci z kariotypem z większą liczbą aberracji gorzej odpowiadają na leczenie, co wiąże się ze wznową i progresją choroby (Aukema i wsp., 2015).

Badanie cytogenetyczne jest istotnym elementem algorytmu diagnostycznego chłoniaka Burkitt'a, potwierdzającym ostatecznie wstępną diagnozę, uzyskaną w wyniku badania histopatologicznego i analizy immunofenotypu. Pod względem immunofenotypowym BL charakteryzują następujące odczyny: CD20+/CD10+/IgM+/MYC+/BCL-6+/Tcl1+/ CD44- / Mum1-/CD138-/BCL-2-. Blisko 100% komórek jest Ki67+ i CD71+++. W cytometrii przepływowej komórki BL wykazują ekspresję CD45^{bright} i antygenów limfocytów B (CD19, CD20, CD22 i CD79a), HLADR, CD77 i ko-ekspresję CD43 oraz wykazują nagromadzenie monoklonalnego łańcucha ciężkiego klasy IgM oraz jednego z łańcuchów lekkich (kappa lub lambda). Komórki BL nie wykazują ekspresji antygenów: CD5, CD11c, CD23, CD25, TdT. W części przypadków może występować różnicowanie plazmocytoidne: CD16&CD56+, CD56+, CD138+ (Walewski i wsp., 2009).

Pomimo dużej agresywności BL, cechującej się blisko 100% frakcją wzrostową - Ki67 (MIB-1) 100% (> 95%), co skutkuje najkrótszym wśród nowotworów czasem podwojenia masy (około 26 godzin), ten typ chłoniaka charakteryzuje się dużą wrażliwością na chemioterapię. Celem leczenia jest uzyskanie całkowitej remisji (CR – *complete remission*)

choroby w pierwszym podejściu i wyleczenie pacjenta. Jako że nie ma skutecznego leczenia choroby nawrotowej i opornej, uzyskanie jednoznacznej diagnozy przed podjęciem leczenia jest kluczowe dla powodzenia terapii. Tę możliwość zapewnia kompleksowa diagnostyka z użyciem narzędzi cytogenetycznych.

Obecnie w BL leczeniem z wyboru jest intensywna immunochemioterapia z zastosowaniem dużych dawek leków alkilujących i antymetabolitów oraz leczenia dokanałowego. Pierwszym wysoce aktywnym programem wprowadzonym do leczenia BL u dorosłych jest program CODOX-M/IVAC (cyklofosfamid, winkrystyna, doksorubicyna, metotreksat, ifosfamid, etopozyd, cytarabina), stosowany w skojarzeniu z rytuksymabem, składający się z 2 kursów R-CODOX-M podawanych naprzemiennie z 2 kursami R-IVAC. Drugim programem o wysokiej aktywności jest GMALL (*German Multicenter Adult ALL Study Group*) B-ALL/NHL 2002, który obejmuje 6 bloków 5-dniowej chemioterapii zawierającej metotreksat, cytarabinę, cyklofosfamid, ifosfamid, windezynę, doksorubicynę i deksametazon. Każdy blok chemioterapii jest poprzedzony podaniem rytuksymabu. Ponadto stosuje się trójkowe leczenie dokanałowe. Leczenie rozpoczyna się od prefazy zawierającej cyklofosfamid w dawkach frakcjonowanych i deksametazon. W przypadku zastosowania optymalnego leczenia program ten umożliwia uzyskanie CR u około 90% chorych i długotrwałego przeżycia całkowitego wynoszącego 88%. Prawdopodobieństwo 2-letniego przeżycia po zastosowaniu programu CODOX-M/IVAC, które jest w przypadku BL równoznaczne z uzyskaniem wyleczenia, wynosi około 80%. Po upływie 1 roku od zakończenia leczenia nawroty BL zdarzają się wyjątkowo. Monitorowanie remisji powyżej 2 lat od zakończenia leczenia nie jest konieczne (Walewski, 2013). U pacjentów z dodatkowymi obciążeniami takimi jak rozsiana choroba, infekcja HIV lub zaawansowany wiek stosowany jest mniej toksyczny protokół DA-EPOCH-R lub –RR zawierający etopozyd, prednizolon, winkrystynę, cyklofosfamid, doksorubicynę i standardową lub podwójną dawkę rytuksymabu. Zastosowanie tego leczenia również skutkuje wysokim odsetkiem wyleczeń (Gastwirt i wsp., 2018).

Wybór odpowiedniego schematu terapii jest kluczowym elementem, pozwalającym na uzyskanie optymalnych wyników leczenia. Na ten wybór wpływają zarówno precyzyjna diagnoza, jak i znajomość czynników rokowniczych, które wykazują silną korelację z wynikiem leczenia. W wielu nowotworach hematologicznych markery cytogenetyczne stanowią podstawę klasyfikacji bądź są uznanym, często niezależnym, czynnikiem

rozkładowym. W innych nowotworach - poszukiwania takich specyficznych aberracji jest w toku, a w ostatnich latach postęp wiedzy w tym zakresie jest szczególnie dynamiczny.

W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił istotny postęp w diagnostyce chłoniaków agresywnych o morfologii chłoniaka Burkitta. Jak wiadomo około 5-10% przypadków agresywnych chłoniaków o morfologii chłoniaka Burkitt'a nie wykazuje rearanżacji genu *MYC* zarówno w klasycznym badaniu kariotypowym jak i molekularnym techniką FISH (van Rijk i wsp., 2008, Evans i wsp., 2007). Zjawisko to może być spowodowane różnymi mechanizmami, takimi jak odległe punkty pęknięć, które nie są pokryte przez sondy FISH czy insercje *MYC* w *IG* lub *IG* w *MYC* (Jaffe i wsp., 2011, Wagener i wsp., 2019). Przypadki takie klasyfikowano początkowo jako nietypowy chłoniak BL/Burkitt-like według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia 2001 (Jaffe i wsp., 2001). Optymalna strategia terapeutyczna dla tej prowizorycznej jednostki nie została ostatecznie ustalona, a wyniki leczenia były niezadowalające. W 2008 roku włączenie danych genetycznych do klasyfikacji WHO umożliwiło wyznaczenie nowej tymczasowej jednostki, „Chłoniak z komórek B, niesklasyfikowany, z cechami pośrednimi między BL a DLBCL” (*intDLBCL - Diffuse Large B-cell Lymphoma/BL, NOS - unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL*) (Swerdlow i wsp., 2008). To rozróżnienie miało znaczące implikacje kliniczne, bowiem przypadki takie, wykluczone z grupy klasycznych chłoniaków Burkitt'a, były raczej poddawane terapii właściwej dla DLBCL (Thomas i wsp., 2011). O ile wysoki odsetek przypadków BL można było wyleczyć za pomocą krótkiej, intensywnej chemioterapii wieloczynnikowej i profilaktyce ośrodkowego układu nerwowego, to skuteczność leczenia w *intDLBCL* była mierna. Standardem leczenia w DLBCL był schemat R-CHOP (rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon), nie był on jednak dostatecznie skuteczny w przypadkach *intDLBCL/BL, NOS.*

Niewyjaśniony status takich przypadków chłoniaka agresywnego, o cechach pośrednich pomiędzy DLBCL a BL skłonił nas do głębszych poszukiwań nie określonych do tej pory zmian cytogenetycznych w tej grupie. Obfitość materiału diagnostycznego, dostępna w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym (NIO-PIB), umożliwiła nam analizę genetyczną grupy tych rzadkich chłoniaków, których charakterystyka genetyczna była do tej pory niekompletna. Zgromadzenie unikalnego materiału biologicznego pozwoliło mi na zdefiniowanie nowych zmian cytogenetycznych, połączone z ich szczegółową charakterystyką, a także przeprowadzenie

dalszych, pogłębionych badań genetycznych w zakresie określenia wzoru zmian cytogenetycznych i molekularnych w obrębie wcześniej zdefiniowanych, diagnostycznie użytecznych aberracji.

Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q

Przynajmniej część przypadków BL bez rearanżacji *MYC* należy obecnie do nowej, tymczasowej jednostki WHO 2017 „Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q” (BLL,11q - *Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*), do wyodrębnienia której przyczyniły się wyniki naszych pionierskich badań (Pieńkowska-Grela (...), Grygalewicz i wsp., 2011). Praca opublikowana w 2011 roku przez prof. Pieńkowską-Grela i zespół Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki NIO-PIB, zawierała pierwszy w literaturze przedmiotu opis grupy chłoniaków z nowo opisaną aberracją długiego ramienia chromosomu 11 (11q), wykrytą na podstawie analizy genetycznej, przeprowadzonej metodami klasycznej cytogenetyki i FISH, w której brałam czynny udział.

Na podstawie powyżej zacytowanej pracy oraz trzech innych publikacji (Salaverria i wsp., 2014; Zajdel i wsp., 2015; Ferreira i wsp., 2015) powstałych z wykorzystaniem bardziej zaawansowanych technik mikromacierzowych i molekularnych, chłoniak Burkitt-like z powieleniem i terminalną utratą 11q został uwzględniony w rewizji poprzedniej klasyfikacji WHO 2008, jako tymczasowa jednostka chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q (BLL,11q), co ukazało się w formie publikacji w 2016 (Swerdlow i wsp., 2016). Według obecnej definicji, opublikowanej w rewizji 4 edycji klasyfikacji WHO Nowotworów Hematopoetycznych i Tkanek Limfoidalnych z 2017 roku, grupę tę charakteryzuje brak rearanżacji genu *MYC* przy obecności specyficznej zmiany chromosomowej jednoczesnej duplikacji i delecji 11q, wobec morfologii komórek, immunofenotypu oraz profilu ekspresji genów, a także przebiegu klinicznego, zbliżonych do BL (Swerdlow i wsp., 2017).

Wczesne wyniki własne, a także wyniki moich późniejszych badań, prowadzonych w tym obszarze w multidyscyplinarnych zespołach badawczych, dzięki zgromadzeniu unikalnego materiału diagnostycznego w NIO-PIB, stały się podstawą analizy zmian cytogenetycznych w BLL,11q z zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych, stanowiących przedmiot moich bieżących zainteresowań naukowych.

Cel badań

Pierwotnym celem moich badań było poszukiwanie alternatywnych aberracji, które występują w grupie agresywnych chłoniaków o charakterystyce chłoniaka Burkitt'a, a nie wykazujących typowych dla tej grupy translokacji z równoczesnym zaangażowaniem genu *MYC* i genów łańcuchów immunoglobulin (etap I).

Celem dalszych moich badań była szczegółowa cytogenetyczna charakterystyka grupy agresywnych chłoniaków B-komórkowych niosących aberrację 11q w postaci duplikacji i terminalnej delecji. W dalszym przebiegu badań skupiłam się na szczegółowej charakterystyce wykrytej przez nas zmiany 11q oraz analizy jej występowania z innymi zmianami cytogenetycznymi, ze szczególnym uwzględnieniem statusu genu *MYC*, na tle przebiegu klinicznego choroby (etap II).

Materiał i metody badawcze

Materiałem badanym były komórki nowotworowe, uzyskane od 16 pacjentów z podejrzeniem agresywnego chłoniaka B-komórkowego (B-NHL - *B-cell Non-Hodgkin's lymphoma*), w wyniku przeprowadzenia cienkoigłowej biopsji aspiracyjnej (FNAB - *fine needle aspiration biopsy*). Należy podkreślić unikalność opisywanej, nowej jednostki BLL,11q. Przedstawianych 16 pacjentów zostało wyodrębnionych z grupy około 2000 B-NHL diagnozowanych rutynowo w Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki (SPC) NIO-PIB w latach 2000-2016, stanowiąc jedynie 0,8% przypadków agresywnych chłoniaków B komórkowych. Diagnostyka patomorfologiczna, przeprowadzana przed badaniem cytogenetycznym obejmowała badanie histopatologiczno-immunohistochemiczne (HP/IHC) lub cytologię rozmazów barwionych metodą May-Grunwald-Giemza, wykonywanie w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej (ZPIDL) NIO-PIB. Równolegle z badaniem cytogenetycznym przeprowadzano w Pracowni Cytometrii ZPIDL badanie immunofenotypu komórek techniką cytometrii przepływowej (FCM – *Flow Cytometry*).

Biopsyjny materiał komórkowy otrzymywany przez SPC poddawany był hodowli *in vitro* w specyficznych, wypracowanych doświadczalnie warunkach dla uzyskania maksymalnej ilości figur podziałowych dla analizy kariotypowej.

Badanie 16 pacjentów zostało przeprowadzone przy zastosowaniu następujących technik:

- klasycznej analizy kariotypowej (CC – *Classical Cytogenetics*) metafaz barwionych różnicowo barwnikiem Wright dla uzyskania prążków G i C

- fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) z użyciem sond: MYC BAP, BCL2 BAP, BCL6 BAP, CCND1 BAP, MLL BAP, LSI ATM (SO), TelVision 11q (D11S1037)(SO), CEP11 (SA) oraz WCP11 (Vysis Abbott Molecular, Downers, Grove, IL)
- porównawczej hybrydyzacji genomowej wraz z badaniem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu na bazie mikromacierzy (SNP/aCGH) CytoSure Haematological Cancer and SNP Array (8x60k) (Oxford Gene Technology, Yarnton, UK).

Opis wyników i dyskusja

Odkrycie aberracji 11q (etap I)

W etapie I aberracja 11q w chłoniakach o cechach BL została opisana przez nas po raz pierwszy jako duplikacja z inwersją powielonego regionu dup(11)(q23q13), występująca u 4 pacjentów w przypadkach *MYC*-negatywnych chłoniaków Burkitt'a, wówczas zdiagnozowanych, zgodnie z klasyfikacją WHO 2008, jako Inter-DLBCL /BL (Pieńkowska-Grela (...) Grygalewicz i wsp., 2011, załącznik 5, pozycja 1). Przedstawione chłoniaki bez rearanżacji genu *MYC* wykazywały typową morfologię chłoniaka Burkitt'a, immunofenotyp FCM z pewnymi odchyleniami w porównaniu z typowymi BL. Badanie FISH pozwoliło na bliższą charakterystykę zmiany 11q z wytyczeniem przybliżonych punktów pęknięcia.

Badanie kariotypowe

Przeprowadzono analizę kariotypową, która w 4 przypadkach ujawniła zaburzenia długiego ramienia chromosomu 11 przy braku typowych dla BL translokacji z zaangażowaniem genu *MYC*. Stwierdzono występującą klonalnie, powtarzalną zmianę chromosomową w postaci duplikacji 11q. W 2/4 przypadków była to jedyna aberracja kariotypowa. U pozostałych dwóch pacjentów, jako zmiany dodatkowe występowały: trisomia 12 lub kariotyp kompleksowy z licznymi aberracjami: monosomią 13, addycjami add(8)(p21) i add(18)(q22), chromosomem pochodnym der(14)t(4;14)(q31;q13),+mar.

Badanie FISH

Badanie FISH sondą malującą (WCP11), specyficzną dla całego chromosomu 11, wykazało że we wszystkich 4 przypadkach aberrantny chromosom 11 składa się wyłącznie z

materiału pochodzącego z chromosomu pary 11. Dalsze badania z sondami punktowymi specyficznymi dla centromeru 11 oraz genów *CCND1* (11q13), *ATM* (11q22.3) i *MLL* (*KMT2A*)(11q23) potwierdziły duplikację regionu pokrytego przez wszystkie trzy sondy oraz inwersję zduplikowanego fragmentu wykazaną na chromosomach w stadium metafazy. W jednym przypadku stwierdzono amplifikację sekwencji pokrytej przez sondę *MLL*. Na podstawie badania FISH powielony region 11q został określony jako duplikacja z inwersją - dup(11)(q23q13).

Wszystkie te przypadki, wykazywały dup(11)(q23q13). Pozwoliło to nam przedstawić hipotezę, że przy braku rearanżacji genu *MYC*, dup(11)(q23q13) jest związana z chłoniakami granicznymi o morfologii podobnej lub identycznej do BL, tworząc odrębną podgrupę klasyfikacyjną.

Hipoteza ta została potwierdzona na kilkunastu przypadkach (w tym w 4 wstępie scharakteryzowanych przez nas) przez inne grupy badawcze (Salaverria i wsp., 2014; Zajdel i wsp., 2015; Ferreira i wsp., 2015). W badaniach o wyższej rozdzielczości wykazano, że duplikacji 11q zawsze towarzyszy, niewidoczna w badaniu kariotypowym, delecja terminalna i w rezultacie agresywny chłoniak z wykazaną przez nas zmianą cytogenetyczną został włączony jako jednostka prowizoryczna do zaktualizowanej klasyfikacji WHO 2017 pod nazwą Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q (*Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*).

Charakterystyka genetyczna aberracji 11q oraz status genu *MYC* (Etap II)

Wyniki II etapu moich badań obejmują efekty analizy grupy kolejnych 11 pacjentów w trakcie rozpoznania agresywnego chłoniaka B-komórkowego z aberracją 11q (Grygalewicz i wsp., 2017 załącznik 5, pozycja 2) oraz opis jednego przypadku post-transplantacyjnego BLL, 11q po przeszczepie nerki (Grygalewicz i wsp., 2020 załącznik 5, pozycja 3). Badano całościowe zmiany kariotypowe, ze szczególnym uwzględnieniem struktury aberrantnego chromosomu 11 oraz statusu genu *MYC*. W tym celu zastosowano metody od klasycznej analizy kariotypowej, poprzez badanie FISH do charakterystyki zmiany z wykorzystaniem mikromacierzy SNP/aCGH, zwiększając kolejno rozdzielczość analizy zmian genetycznych.

Badanie kariotypowe

Aberracja 11q

Analiza kariotypu, w 10/11 analizowanych przypadków, wykazała kariotyp kompleksowy. W pozostałym 1/11 przypadku aberracja 11q była jedynym, klonalnym odstępstwem od normy, potwierdzając tym samym zasadnicze znaczenie tej zmiany w procesie karcinogenezy w badanej grupie chłoniaków agresywnych.

Duplikacja 11q była obecna w każdym badanym przypadku, jednak rozmiar powielonego regionu 11q był różny. Największa duplikacja obejmowała fragment 11q pomiędzy prążkami 11q12.1 i 11q24.3, natomiast najmniejszy duplikowany region zawierał się pomiędzy prążkami 11q22.2 i 11q24.1. U jednego z pacjentów stwierdzono trzy różne, zmienione chromosomy, niosące materiał 11q. Rozdzielczość badania kariotypowego jest z definicji zbyt niska, aby wykazać terminalną delecję 11q.

W post-transplantacyjnym przypadku BLL, 11q wykonane badanie kariotypowe ujawniło w kariotyp kompleksowy. Analizę przeprowadzono w dwóch punktach czasowych: w momencie rozpoznania przed rozpoczęciem terapii i w jej trakcie. Oba badania wykazały obecność nieprawidłowego chromosomu 11 opisanego jako duplikacja 11q - dup(11)(q22q24). W pierwszym badaniu stwierdzono 12, a w drugim 18 różnych aberracji, co wskazuje na progresję zmian w przebiegu choroby.

W całej badanej grupie najczęstszymi zmianami towarzyszącymi aberracji 11q były zaburzenia chromosomu 8 (8q24), delecja 6q oraz trisomia 12.

Zaburzenia genu *MYC*

Najczęstszymi, powtarzalnymi zmianami pozostałych chromosomów w grupie 11 badanych przypadków były translokacje, wskazujące na rearanżację genu *MYC* (8q24) wykazane w 5 z nich. Translokacje t(8;14)(q24;q32) i t(8;22)(q24;q11) są typowymi aberracjami, angażującymi geny łańcuchów immunoglobulin: ciężkiego *IGH* (14q32) lub lekkiego *IGL* (22q11).

Badanie FISH

Aberracja 11q

W celu przybliżenia wielkości regionów duplikacji 11q i potwierdzenia obecności delekcji terminalnej zastosowano panel sond FISH specyficznych dla genów *CCND1* (11q13.3), *ATM* (11q22.3), *KMT2A* (11q23.3) oraz subtelomerowego regionu D11S1037 (11q25). Każda z sond była hybrydyzowana pojedynczo wraz z sondą specyficzną dla centromeru chromosomu 11, będącą sondą kontrolną. Stosunek liczby sygnałów sondy centromerowej do pozostałych sond wskazywał na przybliżoną wielkość rejonu duplikacji, a brak jednego sygnału sondy D11S1037 potwierdzał utratę fragmentu telomerowego. U 2/11 pacjentów na aberrantnym chromosomie 11 stwierdzono po dwa sygnały sond specyficznych dla genów *CCND1*, *ATM* i *KMT2A*, co świadczy o duplikacji znakowanego regionu. W 1/11 przypadku odnotowano po trzy sygnały wszystkich trzech sond, na zmienionym chromosomie 11, potwierdzające triplikację 11q. U 1/11 pacjenta powielenie obejmowało mniejszy obszar, zawierający sondy specyficzne dla genów *ATM* i *KMT2A*, bez powielenia *CCND1*. W 5/11 przypadkach występowała większa liczba sygnałów sondy specyficznej dla genu *KMT2A* w stosunku do sygnałów sond *CCND1* i/lub *ATM*, co wskazywało na obecność dodatkowych powieżeń węższego obszaru w rejonie duplikacji. U 2/11 pacjentów rejon duplikacji 11q obejmował obszar znakowany przez sondy *CCND1* i *ATM* przy jednoczesnej utracie sygnału *KMT2A*. Przeprowadzenie badania FISH na chromosomach metafazalnych umożliwiło określenie wzajemnego położenia sygnałów na nieprawidłowym chromosomie 11. Wykazano inwersję powielonego regionu 11q w 9/11 przypadków. U 1/11 pacjenta duplikacja miała charakter linearny, bez inwersji. W pozostałym 1/11 przypadku obecność inwersji nie mogła być określona ze względu na zbyt małą wielkość duplikowanego obszaru, ponieważ w powielonym regionie znajdowała się tylko sonda *KMT2A*.

Utrata subtelomerowego sygnału sondy D11S1037(11q25) została potwierdzona w 10/11 przypadków. U 1/11 pacjenta występowały jednocześnie dwa lub trzy sygnały sondy centromerowej i D11S1037.

W przypadku post-transplantacyjnym wzór znakowania sondami dla chromosomu 11 potwierdził obecność duplikacji 11q z terminalną delecją, ponadto znakowanie wykazało występowanie dodatkowego materiału 11q na chromosomie markerowym (mar1).

Zaburzenia genu *MYC*

Status genu *MYC* zbadano we wszystkich 11 przypadkach, wykorzystując sondę rozdzielczą, wykazującą rearanżację genu. U 6/11 pacjentów stwierdzono prawidłowy układ sygnałów wykluczający rearanżację *MYC*. W pozostałych 5/11 przypadkach, w których w badaniu kariotypowym występowały translokacje t(8;14)(q24;q32) i t(8;22)(q24;q11), potwierdzono rearanżację genu *MYC*. Była to najbardziej zaskakująca obserwacja prezentowanej pracy, ponieważ definicja BL_L11q zakłada brak rearanżacji genu *MYC*, której postulowanym substytutem jest równoczesna duplikacja i delecja 11q, która powoduje obraz kliniczny i histopatologiczny choroby podobny do BL. *MYC*-pozytywne przypadki z aberracjami 11q zostały sklasyfikowane, na podstawie morfologii i immunofenotypu, jako klasyczny BL lub chłoniak o wysokiej złośliwości niesklasyfikowany (HGBL, NOS – *High Grade B-cell Lymphoma, not otherwise specified*) z rearanżacją *MYC*. W momencie publikacji (Grygalewicz i wsp., 2017 załącznik 5, pozycja 2) przegląd literatury przedmiotu ujawnił tylko jeden opisany przypadek agresywnego chłoniaka ze współistniejącą duplikacją i delecją 11q oraz rearanżacją *MYC* (Havelange i wsp., 2016). W przypadku post-transplantacyjnym w nie wykazano rearanżacji genu *MYC*. W pierwszym badaniu stwierdzono powielenie *MYC* do trzech kopii oraz amplifikację niezrearanżowanego genu w 2% komórek. W drugim badaniu odsetek komórek z amplifikacją *MYC* sięgał 97%. Uważa się, że amplifikacja genów może mieć podobny efekt do translokacji z zaangażowaniem onkogenów, prowadzący do ich nadekspresji (Nguyen i wsp., 2017).

W ostatnim okresie zostały opublikowane jeszcze dwa przypadki agresywnych chłoniaków o morfologii BL-DLBCL z aberracją 11q i rearanżacją genu *MYC* (Horn i wsp., 2021). Te pojedyncze doniesienia potwierdzają moją wcześniejszą obserwację. Można więc przypuszczać, że obecność aberracji *MYC* w części przypadków obciążonych aberracją 11q może być przyczynkiem się do korekty definicji tymczasowej jednostki WHO 2017 „Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q”.

Badanie SNP/aCGH

Zmiany 11q

Zastosowanie techniki o największej rozdzielczości, czyli SNP/aCGH umożliwiło dokładniejszy wgląd w wielkość i strukturę rejonów duplikacji i delecji 11q w poszczególnych

przypadkach. Wykazano dwa typy duplikacji 11q: dużą, powyżej 50 Mpz i małą poniżej 20 Mpz. Obu typom duplikacji towarzyszyła terminalna delecja. Duża duplikacja została stwierdzona u 6/11 pacjentów a wielkość zduplikowanego regionu zawierała się od 71.39 Mpz (11q12.1q24.3) do 51.27 Mpz (11q13.4q24.1). W tych przypadkach wielkość terminalnej delecji mieściła się w zakresie od 6.75 Mpz (11q24.3q25) do 21.09 Mpz (11q23.2q25). Małą duplikację wykazano w 4/11 przypadkach. Wielkość duplikowanego obszaru wynosiła od 11.95 Mpz (11q22.3q24.1) do 18.97 Mpz (11q22.2q23.3). Dodatkowo małej duplikacji zawsze towarzyszyło powielenie mniejszego regionu w jej obrębie wielkości od 1.46 Mpz (11q23.3) do 5.26 Mpz (11q23.3q24.1). Najmniejszy region powielenia obejmował 48 genów w tym *KMT2A*. Był on około dwa razy większy od regionu amplifikacji opisanego przez Salaverrię i wsp., jednak oba regiony pokrywały się. W przedstawianej grupie pacjentów występowanie małych duplikacji z dodatkowymi powieleniami było notowane jedynie w dużych guzach powyżej 20 cm średnicy, które zlokalizowane były zaotrzewnowo. Umieszczenie to mogło przyczynić się do opóźnienia momentu diagnozy i wiązać się z progresją choroby. Wielkość terminalnej delecji 11q w tych 4/11 przypadkach zawierała się pomiędzy 11.36 Mpz (11q24.1q25) i 15.12 Mpz (11q23.3q25). U jednego pacjenta, w grupie małych duplikacji, stwierdzono mały region delecji biallelicznej wielkości 774.52 kbp, który obejmował tylko 6 genów: *ETS1*, *FLI1*, *KCNJ1*, *KCNJ5*, *C11orf45*, *TP53AIP1*. Wykazany region był zgodny z regionem delecji biallelicznej opisanego przez Salaverrię i wsp., jednak był o połowę mniejszy. Zawierał dwa geny typowane na kluczowe w tej aberracji, czyli *ETS1* i *FLI1*, potwierdzając tym samym ich możliwy udział w patogenezie nowotworów z aberracjami 11q. W przypadku 1/11 pacjenta, u którego w badaniu kariotypowym wykazano trzy różne chromosomy niosące aberracje 11q, a w badaniu FISH nie stwierdzono terminalnej delecji, analiza SNP/aCGH potwierdziła duplikację 11q oraz ujawniła UPD w rejonie 11q24.1q25, który ulegał delecji w pozostałych analizowanych przypadkach. Zastosowanie metody SNP dało możliwość detekcji tej zmiany, niewidocznej w pozostałych badaniach. Stwierdzenie UPD było podstawą włączenia tego pacjenta do badanej grupy. Zakładając, że w rejonie delecji znajduje się gen lub geny supresorowe, których inaktywacja może promować tumorogenezę w tej grupie pacjentów, mechanizm UPD może prowadzić do eliminacji prawidłowej kopii genu supresorowego i zastąpienia jej powieloną zmutowaną kopią. W takim przypadku kandydatem może być gen *ETS1* występujący w rejonie delecji biallelicznej, którego mutacja została opisana przez Salaverrię i wsp. u pacjentów z aberracjami 11q. W

tym przypadku delecja bialleliczna może być alternatywnym do mutacji, mechanizmem inaktywacji tego genu.

W 9/11 przypadkach analiza SNP wykazała LOH potwierdzający terminalną delecję 11q. W pozostałym 1/11 przypadku brak LOH w regionie delekcji związany był najprawdopodobniej ze zbyt małym zakresem tej zmiany (6.75 Mbp), który znajdował się poniżej rozdzielczości analizy SNP.

W badanej grupie 11 pacjentów nie stwierdzono wspólnych punktów pęknięć w rejonach duplikacji i delekcji, co wyklucza powtarzalną aktywację konkretnego onkogenu lub dezaktywację genu supresorowego.

U pacjenta z post-transplantacyjnym BLL,11q analiza mikromacierzowa, w obu punktach czasowych, potwierdziła obecność dużej duplikacji 11q wielkości 60.58 Mbp (11q12.1q23.3) z terminalną delecją wielkości 16.31 Mbp (11q23.3q25). Ponadto w drugim badaniu wykazano w obszarze duplikacji nietypowy rejon amplifikacji (11q22.1q22.2) wielkości 1,94 Mbp obejmujący 12 genów (*CTD-2383M3.1*, *ARHGAP42*, *PGR*, *TRPC6*, *MIR3920*, *ANGPTL5*, *KIAA1377*, *C11orf70*, *YAP1*, *BIRC3*, *BIRC2*, *TMEM123*). Wynik ten również wskazuje na progresję zmian genetycznych w trakcie przebiegu choroby.

Wykazany w moich badaniach minimalny obszar terminalnej delekcji 11q wielkości 6,75 Mbp uściśla zakres podawany przez innych badaczy. Salaverria i wsp. wykazała najmniejszy tracony obszar wielkości 7,4 Mbp, a Ferreira i wsp. 13,5 Mbp. Zawęziłam również region delekcji biallelicznej do 0,774 Mbp w stosunku do opisanego przez Salaverrię i wsp. wielkości 1,5 Mbp. Wykazałam również, że brak obszaru delekcji terminalnej 11q nie wyklucza rozpoznania BLL,11q, o ile występuje inny mechanizm inaktywacji tego regionu - poprzez disomię jednorodzicielską (UPD).

Zaburzenia genu *MYC*

U pacjenta z post-transplantacyjnym BLL,11q w badaniu SNP/aCGH potwierdzono amplifikację genu *MYC*, wykazaną w badaniu FISH. Określono granice regionu amplifikacji (8q24.13q24.21) obejmującej, oprócz genu *MYC*, 17 innych genów (*MTSS1*, *MIR4662B*, *ZNF572*, *SQLE*, *KIAA0196*, *KIAA0196-AS1*, *NSMCE2*, *TRIB1*, *LINC00861*, *SOD1P3*, *LRATD2*, *PCAT1*, *PCAT2*, *CASC8*, *POU5F1B*, *MYC*, *PVT1*, *MIR1205*). W pierwszym badaniu, przed leczeniem, pik powielenia wskazywał średnio na 4 kopie *MYC* na komórkę, podczas gdy w drugim badaniu średni poziom amplifikacji *MYC* był wyższy i wynosił 15 kopii na komórkę.

Implikacje diagnostyczno-kliniczne.**Charakterystyka cytometryczna i immunofenotypowa chłoniaka BLL,11q**

W badaniu cytometrycznym BLL,11q w znacznym stopniu przypomina klasycznego BL z rearanżacją genu *MYC*. Jest jednak kilka subtelnych cech różniących te dwa agresywne chłoniaki. Chłoniaka BLL,11q charakteryzuje niższa ekspresja antygenów CD38,CD45 w porównaniu z klasycznym BL oraz obecność antygenów CD16/CD56 i CD8. Dzięki tym różnicom chłoniaka BLL,11q można wstępnie zdefiniować na poziomie cytometrycznym na podstawie ekspresji CD16/CD56 i obniżonej ekspresji CD38 w komórkach CD10(+) (Rymkiewicz G, Grygalewicz B, i wsp., 2018, załącznik 5, pozycja 4). W badaniu immunohistochemicznym obrazu BLL,11q i BL są również bardzo podobne. Poza różnicami w barwieniu szczególnie dwóch cząsteczek: LMO2 i CD56. Ekspresja LMO2 i CD56 nie występuje w chłoniakach z rearanżacją genu *MYC*, natomiast jest często obecna w BLL,11q. W chłoniakach BLL,11q z rearanżacją genu *MYC* barwienie LMO2 i CD56 jest negatywne (Rymkiewicz G, Grygalewicz B, i wsp., 2018 załącznik 5, pozycja 4).

Odpowiedź na terapię

Pacjenci zdiagnozowani jako BLL,11q, BL oraz HGBL, NOS z duplikacją i delecją 11q i rearanżacją genu *MYC* dobrze odpowiadają na agresywną terapię wg protokołów GMALL-B-ALL/NHL2002, CODOX-M/IVAC lub DA-EPOCH-R. Całkowitą remisję uzyskało 10/11 chorych w czasie obserwacji wynoszącym 10-98 miesięcy. Z tej grupy ośmiu pacjentów w momencie publikacji żyło bez objawów choroby. Przyczyny śmierci 3/11 pacjentów obejmowały: u jednego pacjenta - toksyczność terapii, u kolejnego - progresję choroby, której powodem było początkowe zastosowanie zbyt łagodnego leczenia protokołem R-CHOP, zaś ostatni pacjent, po uzyskaniu całkowitej remisji, zmarł przyczyn niezależnych od choroby lub leczenia. U pacjenta z post-transplantacyjnym BLL,11q, ze względu na duże ryzyko rozwoju wydolności nerek, zastosowano chemioterapię wg. protokołu R-CHOP. W rezultacie wystąpiła wznowa węzłowa chłoniaka z chemioopornością, co ostatecznie doprowadziło do śmierci pacjenta.

W efekcie wykrycia i szczegółowej charakterystyki aberracji 11q, w kontekście równolegle prowadzonych badań diagnostyki immunofenotypowej/cytometrycznej, powstał algorytm diagnostyczny, stosowany obecnie w NIO-PIB (Rymkiewicz, Grygalewicz i wsp.,

2018 załącznik 5, pozycja 4; Grygalewicz, 2019, załącznik 5, pozycja 5). Algorytm ten, umożliwiający jednoznaczne rozpoznanie przypadków chłoniaków z unikalnej podgrupy BLL,11q, bazuje na analizie materiału diagnostycznego uzyskiwanego techniką biopsji cienkoigłowej i obejmuje równoległe stosowanie metody cytometrii przepływowej oraz klasycznego badania kariotypowego/fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FNAB/FCM/CC/FISH).

W badaniu cytogenetycznym, w przypadku podejrzenia chłoniaka Burkitt'a, rutynowo stosuje się, obok analizy kariotypu, badanie FISH z zestawem trzech sond rozdzielczych: *MYC*, *BCL2* i *BCL6*, wskazującym na obecność lub brak rearanżacji wymienionych genów. Rozszerzone badanie FISH należałoby rutynowo przeprowadzać w przypadkach chłoniaków o morfologii BL bez rearanżacji *MYC*. Obok analizy kariotypowej, pozwalającej na wykrycie charakterystycznego powielenia fragmentu długiego ramienia chromosomu 11, podstawą cytogenetycznej diagnostyki przypadków BLL,11q jest jednocześnie powielenie sygnałów hybrydyzacyjnych sondy komplementarnej do genu *KMT2A* i utrata sygnału sondy subtelomerowej 11q. Badanie to może być przeprowadzone zarówno na świeżym materiale biopsji lub na skrawkach parafinowych (Grygalewicz B, 2019, załącznik 5, pozycja 5). Niezależnie od wyniku innych badań diagnostycznych (morfologicznych, immunofenotypowych, cytometrycznych), wskazujących na cechy nietypowego chłoniaka typu Burkitt'a, to potwierdzenie obecności charakterystycznych zmian genetycznych jest niezbędnym warunkiem rozpoznania BLL,11q. Taka jednoznaczna informacja pozwala na podjęcie decyzji o leczeniu intensywną immunochemioterapią stosowaną w leczeniu BL. W naszej grupie pacjentów BLL,11q taka terapia umożliwiła uzyskanie całkowitej remisji u 80% chorych, a następnie brak nawrotu choroby w 5 letnim okresie obserwacji. Podobny efekt leczenia uzyskuje się u pacjentów z klasycznym chłoniakiem Burkitt'a (Rymkiewicz G, Grygalewicz B, 2018, załącznik 5, pozycja 4).

Wnioski wynikające z Osiągnięcia Naukowego

1. Odkryliśmy specyficzną zmianę kariotypową: dup(11)(q23q13), związaną z agresywnym chłoniakiem o morfologii chłoniaka Burkitt'a bez rearanżacji genu *MYC*, będącą podstawą wyróżnienia nowej jednostki klasyfikacyjnej WHO 2017 - Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q. (Załącznik 5, poz. 1 cyklu publikacji).
2. Po raz pierwszy wykazałam istnienie dwu typów duplikacji 11q: większej (powyżej 50 Mpz) i mniejszej (poniżej 20 Mpz) z małą wewnętrzną multiplikacją obszaru w którym znajduje się gen *KMT2A*, odpowiadających klinicznie odpowiednio małym i dużym (powyżej 20cm średnicy) guzom (Załącznik 5, poz. 2 cyklu publikacji).
3. Potwierdziłam, że w przeważającej większości przypadków zduplikowany region 11q ulega inwersji, wykazałam jednak, że brak takiej inwersji nie wyklucza rozpoznania BLL,11q (Załącznik 5, poz. 1-5 cyklu publikacji).
4. Wykazałam w regionie delecji terminalnej 11q, punktową homozygotyczną delecję bialleliczną, która obejmowała 6 genów, w tym dwa geny kodujące czynniki transkrypcyjne *FLI1* i *ETS1*, która funkcjonalnie może być alternatywą wobec mutacji (Załącznik 5, poz. 2 cyklu publikacji).
5. Opisałam jako pierwsza występowanie w BLL,11q, disomii jednorodzicielskiej (UPD), która - poprzez utratę funkcji genu (ów) zlokalizowanego w tym rejonie - może funkcjonalnie zastępować terminalną delecję 11q (Załącznik 5, poz. 2 cyklu publikacji).
6. Wykazałam brak stałych punktów pęknięć w rejonach duplikacji i delecji, co pozwala na postawienie hipotezy, iż potencjalnym mechanizmem prowadzącym do onkogenezy w grupie BLL, 11q może być zaburzenie równowagi w dawce jeszcze nie określonych genów zlokalizowanych w rejonach duplikacji i delecji (Załącznik 5, poz. 2 cyklu publikacji).
7. W porównaniu do BL chłoniaki BLL,11q w badaniu cytometrycznym przejawiają obniżoną ekspresję CD38, współwystępującą z ekspresją CD16/CD56 w komórkach CD10(+) oraz pozytywne immunohistochemiczne barwienia LMO2 i CD56, co może być podstawą wstępnej selekcji przypadków BLL,11q metodami cytometrycznymi (Załącznik 5, poz. 4 cyklu publikacji).

8. Jako pierwsza udowodniłam na większej grupie pacjentów, że duplikacja i delecja 11q nie jest specyficzna tylko dla BLL,11q bez rearanżacji *MYC*, ale może również występować w *MYC*-pozytywnych chłoniakach BL i HGBL,NOS, będąc pierwotną lub wtórną zmianą genetyczną (Załącznik 5, poz. 2,4 cyklu publikacji).
9. Jako pierwsza wykazałam amplifikację genu *MYC*, w przypadku post-transplantacyjnego BLL,11q, która wskazuje na bardziej agresywny przebieg choroby (Załącznik 5, poz. 3 cyklu publikacji).
10. Obecność aberracji *MYC* w części przypadków obciążonych aberracją 11q może być przyczynkiem się do korekty definicji tymczasowej jednostki WHO 2017 „Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q” (Załącznik 5, poz. 2-4 cyklu publikacji).

Użyteczność kliniczna badań własnych:

1. Wypracowany w NIO-PIB algorytm diagnostyczny oparty na badaniach: patomorfologicznym, cytometrycznym, immunohistochemicznym, cytogenetycznym z uwzględnieniem badania kariotypowego i celowanego badania FISH, umożliwia jednoznaczne rozpoznanie pacjentów BLL,11q.
2. Opracowany w SPC NIO-PIB panel diagnostyczny sond FISH, dedykowanych diagnostyce różnicowej BL/BLL,11q/DLBCL/HGBL,NOS, umożliwia definitywną klasyfikację chłoniaka w oparciu zarówno o materiał żywych komórek z biopsji jak i w materiale archiwalnym (błoczki parafinowe).
3. Obecność amplifikacji genu *MYC* w przypadkach BLL,11q wskazuje na bardziej agresywny przebieg choroby, w związku z tym nawet najmniejszy klon komórek z amplifikacją *MYC* powinien być raportowany w wyniku badania cytogenetycznego, co pozwoli klinicyście na podjęcie optymalnych decyzji terapeutycznych.
4. Pacjenci z duplikacją i delecją 11q powinni być leczeni agresywną chemioterapią według protokołów przeznaczonych dla BL, co znacznie zwiększa ich szanse na uzyskanie kompletnej remisji i całkowite wyleczenie; zastosowanie chemioterapii protokołem R-CHOP powoduje nabycie oporności na leczenie, co w efekcie prowadzi do zgonu pacjenta.

4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od początku mojej pracy zawodowej moje zainteresowania skupiały się na poszukiwaniu cytogenetycznych markerów procesu kancerogenezy, a następnie wykorzystaniu ich w praktyce diagnostycznej. Moje zainteresowania ewoluowały wraz ze zmianami profilu badań prowadzonych w Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki Centrum Onkologii. Początkowo tematem wiodącym były badania naukowe dotyczące cytogenetyki guzów litych, ze szczególnym uwzględnieniem analizy zmian chromosomowych w zarodkowych guzach jąder i jajnika. Następnie profil badań uległ zmianie na bardziej aplikacyjną diagnostykę cytogenetyczną nowotworów hematologicznych. Przedmiotem analizy zostały białaczki i chłoniaki. Tak obszerny materiał diagnostyczny umożliwił dokonanie odkryć, których wynikiem było powstanie wielu prac naukowych przyczyniających się do rozszerzenia wiedzy o charakterze tak poznawczym jak i użytecznym klinicznie.

Badania cytogenetyczne z zarodkowych guzów jądra i jajnika

Od 1995 roku przedmiotem moich badań naukowych były zmiany chromosomowe w guzach jądra człowieka. Celem analizy było szukanie różnic na poziomie kariotypowym pomiędzy dwoma podtypami histologicznymi: nasieniakami (SE - *Seminoma*) i nienasieniakami (NS - *Nonseminoma*), ze szczególnym uwzględnieniem powieżeń materiału krótkiego ramienia chromosomu 12 (12p). Zmiana ta, charakterystyczna dla guzów jądra, może występować w formie izochromosomu i(12p), czyli powielenia całych krótkich ramion chromosomu 12 lub powielenia fragmentów 12p w formie substytutycznych markerów chromosomowych (Pieńkowska i wsp. 1997, Grygalewicz i wsp. 2000, Pieńkowska-Grela i wsp. 2002).

Kolejne badania stanowiły rozwinięcie tematu powieżeń 12p, ze szczególnym uwzględnieniem analizy markerów niosących powielenia mniejszych regionów 12p w celu określenia krytycznych regionów zawierających geny odpowiedzialne za rozwój nowotworów jądra. Wyniki tych badań były tematem mojej rozprawy doktorskiej pod tytułem „Określenie regionów amplifikacji krótkiego ramienia chromosomu 12 w guzach jądra człowieka”. Spodziewałam się, że przy użyciu cytogenetycznych technik molekularnych takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja in situ i porównawcza hybrydyzacja genomowa na bazie mikromacierzy, w odniesieniu do klasycznych badań cytogenetycznych, uda mi się określić geny bądź obszary 12p biorące udział w patogenezie tych nowotworów. Badania

cytogenetyczne przeprowadziłam na wycinkach guzów jąder (17 - SE i 31 - NS). SE, w porównaniu do NS, prezentowały wyższą liczbę chromosomów w komórkach oraz szerszy zakres zmienności ich liczby. We wszystkich analizowanych przypadkach nowotworów wykryłam aberracje 12p. W 81% przypadków stwierdziłam obecność co najmniej jednej kopii i(12p). Średnia liczba kopii i(12p) na komórkę była większa w NS w stosunku do SE i wynosiła odpowiednio 1,7 *versus* 1,35. W pozostałych 19% przypadków zanotowałam występowanie markerów substytutynych, zawierających powielony materiał 12p.

Określiłam dwa obszary selektywnie amplifikowane w markerach substytutynych 12p11.2-12.1 oraz 12p13.2-13.3. W obrębie tych obszarów stwierdziłam wybiórczą amplifikację niektórych genów. W obszarze 12p11.2-12.1 wykazałam dodatkowe kopie genów: *JAW1*, *SOX5*, *EKI1*, *SIAT8*, natomiast w obszarze 12p13.2-13.3 powielonymi genami były: *CDKN1*, *PTPN6* i *DCP1B*. W pracy potwierdziłam, że występowanie dodatkowych kopii materiału 12p jest niezbędnym czynnikiem patogenezy guzów jądra. Tworzenie izochromosomu 12p jest mechanizmem powielenia materiału 12p, specyficznym dla guzów pochodzenia zarodkowego. Wykazałam istnienie co najmniej dwóch obszarów na 12p zawierających geny promujące rozwój nowotworów jądra. Są to regiony 12p11.2-12.1 i 12p13.2-13.3. Selekttywne powielenie materiału jednego z tych regionów wydaje się być warunkiem wystarczającym do powstania guza. W obrębie tych regionów może występować co najmniej kilka genów, których nadekspresja i synergistyczne działanie mogą warunkować progresję tych guzów (Zafarana i wsp. 2003). Pracę doktorską obroniłam przed Radą Naukową Centrum Onkologii-Instytutu w 2003 roku. Po doktoracie kontynuowałam prace nad genetycznymi mechanizmami molekularnymi w guzach jądra.

Byłam współautorką pracy opisującej amplifikację w rejonie 4q12 (McIntyre i wsp. 2005). W centrum amplifikowanego regionu znajdował się gen *KIT*, kodujący transmembranowy receptor kinazy tyrozynowej. Badania wykazały zwiększenie liczby kopii genu *KIT* w 21% guzów typu SE. W NS ta zmiana występowała bardzo rzadko. W większości przypadków rejon powieleń nie obejmował niekodujących sekwencji flankujących oraz znajdujących się w pobliżu genów *KDR* i *PDGFRA*. Nie stwierdzono zwiększenia liczby kopii genu *KIT* w komórkach będących w prekursorowym stadium nowotworu *carcinoma in situ* (CIS), które sąsiadowały z komórkami nowotworowymi. Nadekspresja białka KIT występowała niezależnie od amplifikacji genu, jednak barwienie immunohistochemiczne było silniejsze w przypadkach z powieleniami *KIT* w porównaniu do przypadków bez

amplifikacji. W 13% nasieniaków wykazano obecność aktywujących mutacji *KIT* w egzonie 17, co może wskazywać na rolę produktu genu *KIT* w progresji ze stadium CIS do nasieniakowego guza jądra. Dalsze badania tego procesu mogą prowadzić do opracowania i wprowadzenia mniej toksycznych terapii w leczeniu guzów jądra.

Obszar analiz cytogenetycznych rozszerzyłam o zarodkowe guzy jajnika. Celem pracy było porównanie zmian cytogenetycznych w pierwotnych i nawrotowych guzach granicznych jajnika. Klasycznej analizie cytogenetycznej oraz badaniu fluorescencyjną hybrydyzacją in situ poddałam 11 guzów (6 pierwotnych i 5 nawrotowych). Badane guzy były w stadium klinicznym I oraz III. Zmiany cytogenetyczne zostały stwierdzone w obu grupach. W guzach pierwotnych występowały proste zmiany chromosomowe takie jak dodatkowe kopie chromosomów: 12, 7 i 8. Obecność trisomii 12 i 7 była niezależna od podtypu histologicznego, podczas gdy trisomia 8 stwierdzana była jedynie w podtypie surowicznym. W granicznych guzach nawrotowych obok trisomii 7 i 12 występowały aberracje strukturalne chromosomów 1, 6q, 7q oraz 10q. Powielenia onkogenów *CCND1* i *MYC* były obserwowane w obu badanych grupach. Zmiany te mogą mieć znaczenie prognostyczne w badaniach guzów granicznych jajnika, jednak dane te wymagają dalszych badań (Grygalewicz i wsp. 2009).

Badania cytogenetyczne w nowotworach hematologicznych

Prowadzone badania nad chłoniakami i białaczkami miały na celu poszukiwanie markerów genetycznych mających wpływ na rozwój choroby lub na efekty leczenia. Pracą łączącą temat nowotworów jądra z tematem chłoniaków była publikacja opisująca przypadek 39-letniego mężczyzny z podejrzeniem nowotworu jądra. Wstępna diagnoza histopatologiczna wskazywała na nasieniaka. Badanie cytogenetyczne na materiale uzyskanym z guza wykonaliśmy przy użyciu technik klasycznej cytogenetyki oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ. Wykazaliśmy obecność kariotypu hipotetraploidalnego z występowaniem licznych zmian strukturalnych dotyczących głównie chromosomów 1, 6, 18 i X. Nie stwierdziliśmy specyficznej dla wszystkich guzów jąder aberracji – powielenia 12p. Komórki badanego nowotworu wykazywały natomiast wysoki stopień multiplikacji materiału pochodzącego z chromosomu 18. Aberracje dotyczące tego chromosomu nie są typowe dla guzów jądra, są natomiast charakterystyczne dla chłoniaków nieziarniczych. Uzyskany wynik poddał w wątpliwość pierwotną diagnozę. Powtórna analiza preparatów histologicznych,

wraz z dodatkowym badaniem immunohistochemicznym i histochemicznym, pozwoliła na ostatecznie ustalenie rozpoznania jako chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL – *Diffuse Large B Cell Lymphoma*). Postawienie prawidłowej diagnozy było możliwe dzięki wnikliwej analizie zmian chromosomowych (Grygalewicz i wsp. 2002).

Pozostałe analizy cytogenetyczne dotyczące chłoniaków obejmowały zarówno chłoniaki B- jak i T-komórkowe. W chłoniaku z komórek płaszczka (MCL – *Mantle Cell Lymphoma*), opisaliśmy występowanie typowej zmiany cytogenetycznej jaką jest translokacja t(11;14)(q13;q32), jak również nietypową translokację wariantową t(2;11)(p11.2;q13) bez zaangażowania genu *IGK* (Woroniecka i wsp. 2002, Woroniecka i wsp. 2007). Kolejna praca opisała różne mechanizmy aktywacji genu *MYC* w chłoniakach B-komórkowych, takich jak chłoniak Burkitta, chłoniak Burkitt-like oraz DLBCL (Pieńkowska i wsp. 2005).

W szpiczaku plazmocytowym wykazaliśmy występowanie aberracji cytogenetycznych takich jak masywna utrata 13q, fuzja *FGFR3/IGH*, zmiany liczby kopii genów *CCND1*, *CBFB*, *MAF* i *IGH* w znakowanych komórkach plazmocytów (Rygier i wsp. 2011). Przedstawiliśmy wyniki badania ekspresji miR w chłoniakach Burkitt-like z aberracją 11q. Celem badania było sprawdzenie czy możliwe jest różnicowanie pomiędzy BL, DLBCL i DLBCL/BL, które obejmują BLL,11q, na podstawie wzoru ekspresji miR-155/BIC, miR-21 oraz miR-26a. Przypadki BL i DLBCL/BL, w tym BLL,11q, wykazały znacznie niższy poziom ekspresji miR-155/BIC, miR-21 i miR-26a w porównaniu z DLBCL. Uzyskane wyniki przemawiają za uznaniem BLL,11q za *MYC*-negatywny wariant BL i umożliwiają wyodrębnienie tej podgrupy, na podstawie poziomu ekspresji miR-155/BIC, miR-21 i miR-26a, z heterogennej kategorii DLBCL/BL (Zajdel i wsp. 2015). Opisaliśmy również zmiany cytogenetyczne w Syndromie Richtera (Woroniecka i wsp. 2015).

W chłoniakach T-komórkowych badaliśmy częstość delecji *CDKN2A* (Pastwińska i wsp. 2011). Opisaliśmy również ukrytą fuzję *NUP214-ABL1* w episomach w limfoblastycznym chłoniaku T-komórkowym (Othman i wsp. 2018).

Badania cytogenetyczne białaczek obejmowały zarówno białaczki przebiegu przewlekłym jak i ostrym. W temacie przewlekłej białaczki szpikowej (CML – *Chronic Myeloid Leukemia*) brałam udział w badaniach dotyczących znaczenia delecji submikroskopowych w obszarze fuzji BCR/ABL (Pieńkowska-Grela i wsp. 2008). Badaliśmy również cytogenetyczne czynniki ryzyka u pacjentów z CML w trakcie terapii imatinibem. Wykazaliśmy, że pacjenci z

delecją w regionie fuzji *BCR/ABL* mieli gorsze efekty leczenia niż pacjenci bez delecji. Ryzyko progresji zmian cytogenetycznych w grupie z delecją było ponad 9 razy wyższe niż u pacjentów bez delecji w regionie fuzji i t(9;22) jako jedyną aberracją kariotypową (Pieńkowska-Grela i wsp. 2009).

Opisaliśmy też przebieg leczenia pacjenta z CML z translokacją wielokrotnie złożoną (9;22;6;17;1) (Chudy i wsp. 2020). W badaniach dotyczących ostrych białaczek szpikowych (AML – *Acute Myeloid Leukemia*) opisałam unikalny mechanizm amplifikacji genu *MECOM* w ostrej panmielozie z mielofibrozą (Grygalewicz i wsp. 2012). Przedstawiliśmy również wpływ architektury chromosomów na powstawanie aberracji chromosomowych na przykładzie dobrze rokującej w AML translokacji t(8;21) (Othman i wsp. 2012). W pracy dotyczącej przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL - *Chronic Lymphocytic Leukemia*) opisałam wykorzystanie metod molekularnych w ocenie czynników rokowniczych oraz rodzaje delecji 13q14 i ich wpływ na prognozę w CLL (Gos i wsp. 2008, Grygalewicz i wsp. 2016). U pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL - *Acute Lymphoblastic Leukemia*) prace których byłam współautorką, opisywały nowe zmiany genów *BIRC3*, *KMT2A* i *IGH* oraz ich wpływ na rokowanie (Alhourani i wsp. 2016, Othman i wsp. 2015, Othman i wsp. 2016). Wykazaliśmy także obecność zmian submikroskopowych w ALL z prawidłowym kariotypem (Othman i wsp. 2015).

Poza powyższym monotematycznym cyklem 5 prac będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego nauk medycznych mój dorobek obejmuje 38 publikacji, których jestem autorką lub współautorką. W tej liczbie zawiera się 25 prac z Impact Factor, 2 prace przed doktoratem (1 oryginalna i 1 poglądowa) i 23 po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych (16 prac oryginalnych i 7 opisów przypadków) oraz 13 prac bez IF, 4 przed doktoratem (3 prace oryginalne i 1 opis przypadku) i 9 prac po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych (3 oryginalne, 2 opisy przypadków i 4 prace poglądowe), 4 rozdziałów monografii, w tym jednej w języku angielskim i jednego w skrypcie.

Jestem autorką lub współautorką 75 doniesień zjazdowych, w tym 26 przed doktoratem (11 ze zjazdów międzynarodowych oraz 15 ze zjazdów krajowych); 49 po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych (25 ze zjazdów międzynarodowych oraz 24 ze zjazdów krajowych).

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych łączny IF wynosi 2,609, natomiast punktacja MNiSW – 31 pkt. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych łączny IF wynosi 67,948, natomiast punktacja MNiSW – 842 pkt.

Mój sumaryczny IF wynosi **70,557**, natomiast punktacja **MNiSW – 873 pkt.**

Liczba cytowań prac wynosi **482**, a bez autocytowań 462 (wg. danych bibliometrycznych Web of Science na dzień 31.03.2021, załącznik 8) oraz **565**, natomiast bez autocytowań **410** (wg. danych bibliometrycznych wg bazy Scopus na dzień 31.03.2021, załącznik 8)

Mój **INDEKS HIRSCHA** wynosi: **12** wg Web of Science oraz **13** wg Scopus.

Pełne teksty prac stanowiących mój dorobek naukowy znajdują się w załączniku 7.

Podsumowanie działalności naukowo-badawczej przedstawia analiza bibliometryczna opracowana przez Bibliotekę Naukową NIO-PIB z dnia 01.04.2021. zamieszczona w załączniku 8.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W latach 1997-2002 przebywałam dwukrotnie w Centrum Genetyki Człowieka przy Katolickim Uniwersytecie w Leuven (Belgia), w Zakładzie Genetyki Człowieka pod kierownictwem prof. Anne Hagemeyer na stypendium Fundacji hr Jakuba Potockiego. W roku 1997 odbyłam szkolenie dotyczące fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), w czasie którego nauczyłam się uzyskiwać sondy na wybrane, ściśle określone, fragmenty chromosomów. Umiejętność tą wykorzystałam w badaniach nad strukturą zmian 12p w guzach jądra człowieka. W trakcie mojego drugiego pobytu na Uniwersytecie w Leuven, latach 2001-2002, wykonałam część badań do pracy doktorskiej, zapoznałam się z kolejnymi zastosowaniami techniki FISH - poznając metodę porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH - *Comparative Genomic Hybridization*) na chromosomach. W czasie prowadzenia badań na Uniwersytecie w Leuven otrzymałam stypendium Unii Europejskiej z grupy roboczej WG3-EC COST-B19 '*Molecular cytogenetics of solid tumors*', które umożliwiło mi przeprowadzenie dodatkowych badań do pracy doktorskiej, przy wykorzystaniu nowoczesnej techniki CGH opartej na bazie mikromacierzy w Szpitalu Uniwersyteckim w Nijmegen (Holandia). Efektem

wyżej opisanych aktywności było napisanie rozprawy doktorskiej oraz dwóch publikacji. (Załącznik 6, Załącznik 7: Looijenga, 2003; Zafarana, 2003).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w latach 2003-2004 przebywałam na stypendium post doktoranckim w Instytucie Badań nad Rakiem w Sutton, Royal Marsden Hospital (UK), w Zakładzie Cytogenetyki Molekularnej pod kierownictwem prof. Janet Shipley. Podczas tego stypendium zajmowałam się opracowaniem metod amplifikacji RNA wykorzystywanego do określania wzoru ekspresji RNA na chromosomach techniką CESH (CESH - *Comparative Expressed Sequence Hybridization*) w komórkach guzów jądra. Prowadzałam także badania w *Barts and The London Queen Mary's School of Medicine and Dentistry* w Zakładzie Hematologii pod kierownictwem prof. Deana Nizetica nad mysimi modelami Zespołu Downa, ze szczególnym uwzględnieniem segregacji nadliczbowego ludzkiego chromosomu 21 u myszy syngenicznych. Efektem prowadzonych badań było powstanie dwóch publikacji. (Załącznik 6, Załącznik 7: McIntyre 2005, Mensah 2007).

W ramach współpracy z prof. Thomasem Liehrem z Zakładu Cytogenetyki Molekularnej, Uniwersytetu Klinicznego w Jenie (Niemcy), w latach 2010-2016, uczestniczyłam w molekularnych badaniach cytogenetycznych, dotyczących ostrych białaczek. Badania były przeprowadzone między innymi nowatorskimi technikami takimi jak: trójwymiarowa fluorescencyjna hybrydyzacji in situ i wielokolorowe prążkowanie chromosomów (mMCB - *Multicolor Chromosome Banding*). Efektem współpracy było opublikowanie sześciu wspólnych prac. (Załącznik 6, Załącznik 7: Otchman 2012; 2015; 2015; 2016; 2018; Alhourani 2016).

We współpracy z dr hab. n. med. Beatą Nowakowską z Zakładu Genetyki Medycznej, Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie przeprowadziłam badania dotyczące dokładnego opisu rodzajów delecji 13q14 w przewlekłej białaczce limfocytowej i ich wpływu na prognozę. Drugim podjętym zagadnieniem były badania regionów duplikacji i delecji 11q w chłoniaku Burkitt-like z aberracją 11q. Analizy były przeprowadzone metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej na bazie mikromacierzy oraz badaniem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu na bazie mikromacierzy. Efektem współpracy było powstanie trzech publikacji (Załącznik 7: Grygalewicz 2016; 2017; 2020).

W współpracy z dr n. med. Katarzyną Borg z Pracowni Genetyki Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie zostało przeprowadzone badanie poziomu ekspresji genu *EVI1* (*MECOM*) metodą RT-PCR i opublikowane jako opis przypadku ostrej panmielozy z mielofibrozą z amplifikacją genu *EVI1* (*MECOM*). (Załącznik 7: Grygalewicz, 2012).

We współpracy z dr hab. n. med. Arturem Kowalikiem z Zakładu Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach zostało przeprowadzone badanie metodą NGS na obecność mutacji genu *TP53* u pacjenta z CML z translokacją złożoną t(9;22;6;17;1). Efektem współpracy była publikacja opisu przypadku. (Załącznik 7: Chudy, 2020).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1 Działalność dydaktyczna

- Promotor pracy magisterskiej - pt. „Ocena stopnia zmutowania genu dla regionu zmiennego łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IgV_H*) w grupie pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (CLL)”. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, kierunek biotechnologia. 2014.
- Kierownik specjalizacji laboratoryjnej genetyki medycznej - 5 osób (4 ukończone, 1 w trakcie). W latach 2008-2020 brałam udział w szkoleniu 20 stażystów laboratoryjnej genetyki medycznej, realizujących w Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki staże podstawowe z laboratoryjnej genetyki medycznej oraz staże kierunkowe z cytogenetyki hematoonkologicznej.
- Szkolenie w ramach technik cytogenetycznych – 1 osoba, absolwentka Uniwersytet M. Kopernika, Bydgoszcz
- Elementy cytogenetyki hematologicznej – 1 osoba Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski
- Organizacja pracy w laboratorium Cytogenetycznym – Szpital Specjalistyczny, Brzozów
- Metodyka i interpretacja badań FISH – 2 osoby Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

- Zajęcia ze studentami odbywającymi praktyki wakacyjne w Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki.

6.2 Działalność organizacyjna

- *28th Meeting of European Cell Proliferation Society*, 30 maja - 02 czerwca 2007, Warszawa. Udział w Komitecie organizacyjnym.
- XI Ogólnopolskie Warsztaty Cytogenetyki Hematoonkologicznej. 2010, Warszawa, Udział w Komitecie organizacyjnym.
- Organizacja III Edycji Programu Międzylaboratoryjnej Kontroli Jakości Badań FISH w Hematoonkologii (2011): opieka merytoryczna i prowadzenie B. Pieńkowska-Grela, Udział w Komitecie organizacyjnym.
- Spotkania robocze nt. wyników testów kontroli jakości badań FISH. 2008-2014. Udział w Komitecie organizacyjnym.
- Międzylaboratoryjny Test Kontroli Jakości Badania FISH w Hematoonkologii dla pracowni cytogenetycznych, zajmujących się diagnostyką onkologiczną 2008-2014. Udział w Komitecie organizacyjnym.
- Użyteczność cytogenetyki molekularnej w postępowaniu diagnostyczno-terapeutycznym w onkologii. 19-20.04.2016 Licheń Stary. Udział w Komitecie organizacyjnym.
- Badanie genetyczne w onkologii – czas zmian. 13.01.2018 Warszawa. Udział w Komitecie organizacyjnym.
- Doskonalenie diagnostyki genetycznej w CLL/SLL – metody cytogenetyczne – FISH. 14.06.2019 Warszawa. Udział w Komitecie organizacyjnym.

6.3 Wykłady na zaproszenie

- Genetyczne aspekty nowotworów jąder u dorosłych. V Sympozjum pt. „Postępy w diagnostyce molekularnej i leczeniu nowotworów o podłożu genetycznym u dzieci”. 20-21 czerwca 2005, Stryków.
- Badanie i ocena klonalności locus *IGH* jako niezależne czynniki prognostyczne w przewlekłej białaczce limfocytowej. II Polski Kongres Genetyki, 18-20 września 2007, Warszawa.

- *CytoSure Haematological Cancer+SNP Array in Non-Hodgkin Lymphoma analysis. OGT European User Group Meeting 2015, 27-28 marzec, Stuttgart, Niemcy.*
- *Monoallelic and Biallelic Deletions of 13q14 in a Group of 36 CLL Patients Investigated by CGH Haematological Cancer and SNP Array (8x60K). 17th International Conference on Human Genetics , 25-26 września 2015, Londyn, UK.*
- Znaczenie zmian genetycznych w diagnozowaniu i doborze terapii w białaczkach. Konferencja organizowana przez "Cemed" Tytuł konferencji: Wartość Kliniczna badania genetycznego w onkologii – stan obecny i perspektywy. 20 listopada 2015, Warszawa
- WHO 2016 – Chłoniak Burkitt-like z aberracjami 11q. XVIII Ogólnopolskie Warsztaty Cytogenetyki Hematoonkologicznej, 8-9 maja 2017, Wrocław.
- Metody cytogenetyki molekularnej w różnicowaniu agresywnych B-NHL. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, 12 -14 września 2019, Łódź.
- *Is the Duplication and Deletion of 11q a Specific Change only for Burkitt-like Lymphoma with 11q Aberrations? International Conference on Medical Pathology, 17-19 lutego 2020, Houston, USA.*

6.4 Popularyzowanie nauki w zakresie hematoonkologii

17.04.2021 - wywiad dla Polskiej Agencji Prasowej dotyczący Chłoniaka Burkitt-like z aberracją 11q, który ukazał się na portalach:

- <https://www.pap.pl/aktualnosci/news%2C853719%2Cpolscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-pozwoli-skuteczniej-leczyc>
- <https://www.rynekzdrowia.pl/Badania-i-rozwoj/Odkrycie-polskich-naukowcow-nowego-podtypu-chloniaka-pozwoli-skuteczniej-leczyc-chorych,220918,11.html>
- <https://www.msn.com/pl-pl/zdrowie/nasze-zdrowie/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-ch%2C82oniaka-to-pozwala-skutecznie-leczy%C4%87-chorych/ar-BB1fKkVT?li=BBr5PkU>
- <https://zdrowie.dziennik.pl/nawotwory/artykuly/8144143,chloniak-nowy-typ-nowotworu-rak-ukladu-chlonego-onkologia.html>
- <https://pulsmedycyny.pl/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-zblizony-do-chloniaka-burkitta-1114154>

- <https://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news%2C87408%2Cpolscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-co-pozwala-skutecznie-leczyc>
- <https://www.wnp.pl/parlamentarny/spoleczenstwo/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-co-pozwala-skutecznie-leczyc-chorych,136716.html>
- <https://niezalezna.pl/390902-polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-to-pozwala-skutecznie-leczyc-chorych>
- <https://prk24.pl/53349143/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-co-pozwala-skutecznie-leczyc-chorych>
- <https://www.portalsamorzadowy.pl/polityka-i-spoleczenstwo/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-co-pozwala-skutecznie-leczyc-chorych,273225.html>
- <https://zdrowie.wprost.pl/strefa-pacjenta/nowotwory/10440344/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka.html>
- <https://jedenznas.pl/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-co-pozwala-skutecznie-leczyc-chorych/>
- <https://paluki24.pl/3386/zdrowie/polscy-naukowcy-odkryli-nowy-podtyp-chloniaka-co-pozwala-skutecznie-leczyc-chorych.html>

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1. Kierowanie projektami grantowymi

- Jestem kierownikiem grantu wewnętrznego Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego, pt. „Różnicowanie agresywnych chłoniaków B-komórkowych (B-NHL) poprzez określenie wzoru zmian molekularnych w obrębie cytogenetycznie zdefiniowanych, diagnostycznie użytecznych aberracji: 1) duplikacji/delecji (11q) [dup/del(11q)] oraz 2) insercji w locus genów *MYC* i *IGH*. Ocena profilu mutacyjnego przypadków z dup/del(11q) w kontekście rearanżacji/powielenia genu *MYC*”; SN/GW08/2020. Realizacja 2020-2022.
- Byłam kierownikiem grantu Polskiego Towarzystwa Onkologicznego pt. „Określenie zróżnicowania obszarów delecji chromosomów 13 i 11 w przewlekłej białaczce limfatycznej/chłoniaku z małych limfocytów B jako czynnika rokowniczego”; PTO 4/GNB/K001/2013, projekt własny realizowany w latach 2013-2015.

- Byłam kierownikiem grantu Fundacji Jakuba hr Potockiego pt. „Wykonanie badań wysokorozdzielczą metodą sekwencjonowania nowej generacji (NEXT-Generation Sequencing, NGS)”, 825/18, projekt własny realizowany w latach 2018-2019.
- Byłam współwykonawcą grantu KBN pt. „Analiza zmian klonalnych w przebiegu ostrej białaczki mieloblastycznej z wykorzystaniem techniki klasycznej CGH i macierzy CGH – celem wyodrębnienia użytecznych diagnostycznie markerów proliferacji komórek białaczkowych” we współpracy z Zakładem Genetyki Medycznej UM w Lublinie. KBN 1870/B/P01/2008/35. Projekt realizowany w latach 2008-2012.

7.2 Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda Dyrektora Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie za rok 2003, w kategorii: Najlepsza praca doktorska wykonana przez pracownika Centrum Onkologii i obroniona przed Radą Naukową Centrum.
- Brązowy medal za długoletnią służbę, przyznany postanowieniem z dn.24 sierpnia 2012 przez prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Bronisława Komorowskiego.
- Nagroda im. Pani Profesor Danuty Rożynkowej za najlepszą pracę w dziedzinie cytogenetyki hematoonkologicznej opublikowaną w latach 2016-2018. Nagrodzona praca: The 11q-Gain/Loss Aberration Occurs Recurrently in *MYC*-Negative Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration, as Well as *MYC*-Positive Burkitt Lymphoma and *MYC*-Positive High-Grade B-Cell Lymphoma, NOS.

7.3 Członkostwo w towarzystwach naukowych

- Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka (PTGC) 2000 -
- Sekcja Cytogenetyki Hematoonkologicznej PTGC 2003 -
- European Board of Medical Genetics 2015 -
- Członek założyciel Sekcji Guzów Litych PTGC -

7.4 Recenzje prac naukowych

- Original Article: High Resolution Genome-Wide Analysis Identified Recurrent Genetic Alterations in NK/T-Cell Lymphoma, Nasal Type, Which are Associated with Disease Progression - Medical Oncology (IF=2.634).

- Letter to the editor: Morphologically and immunohistochemically Burkitt's Lymphomas: a single center experience - International Journal of Laboratory Hematology (IF= 2.220).
- Blood work: Blastoid morphology in Burkitt-like lymphoma (BLL) with 11q aberration – Blood (IF=17.794).
- Case report: Non-inverted duplication of 11q, dup(11)(q11q24), in a diffuse large B-cell lymphoma without MYC rearrangement - SN Comprehensive Clinical Medicine (IF=0).

8. Udział w badaniach klinicznych w zakresie oceny cytogenetycznej

- PMC006. Tytuł: Randomizowane badanie 3 fazy oceniające karfilzomib, lenalidomid i deksametazon w porównaniu z monoterapią lenalidomidem u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym po transplantacji . (Polskie Konsorcjum Szpiczakowe).
- CC-4047-MM-007. Tytuł: Otwarte badanie kliniczne III fazy prowadzone z randomizacją i grupą kontrolną porównujące stosowanie melflufenu w skojarzeniu z deksametazonem do pomalidomidu w skojarzeniu z deksametazonem u pacjentów z nawrotową/oporną postacią szpiczaka mnogiego, którzy wykazują oporność na lenalidomid (AM Białystok, główny badacz, prof. Kłoczko), od 22 sierpnia 2017.
- UTX-TGR 304. Tytuł: Randomizowane badanie kliniczne fazy 3 oceniające skuteczność i bezpieczeństwo terapii łączonych ublituximabu i TGR 1202 w porównaniu z obinutuzumabem i chlorambilem u pacjentów z przewlekłą białaczką limfatyczną (CLL) (COI, Warszawa, główny badacz, prof. Walewski,) od 07.03.2018
- TG1701-101 . Tytuł: Badanie farmakokinetyczne i farmakodynamiczne 1 fazy TG-1701, nieodwracalnego inhibitora kinazy tyrozynowej Brutona, u pacjentów z nowotworami z komórek B, od 04.06.2020

9. Konsultacje

- Udział i konsultacje merytoryczne w zakresie uruchamiania i organizacji cytogenetycznych badań diagnostycznych metodą FISH w Szpitalu Specjalistycznym - Podkarpackim Ośrodku Onkologicznym im. ks. Bronisława Markiewicza. 2015 r.
- Konferencja Naukowa z okazji Jubileuszu 10-lecia Polskiej Grupy Szpiczakowej, 21-23 maja, 2015. Lublin. Uczestnictwo w panelu ekspertów, tytuł sesji: Rola zaburzeń cytogenetycznych w wyborze terapii.

Literatura

Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008; 1;111:1534–42.

Beroukhir R, Lin M, Park Y, Hao K, Zhao X, Garraway LA, et al. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput. Biol.* 2006;2(5):e41.

Aukema SM, Theil L, Rohde M, Bauer B, Bradtke J, Burkhardt B, Bonn BR, Claviez A, Gattenlöhner S, Makarova O, Nagel I, Oschlies I, Pott C, Szczepanowski M, Traulsen A, Kluin PM, Klapper W, Siebert R, Murga Penas EM. Sequential karyotyping in Burkitt lymphoma reveals a linear clonal evolution with increase in karyotype complexity and a high frequency of recurrent secondary aberrations. *Br J Haematol.* 2015;Sep;170(6):814-25.

Walewski J, Dąbrowska-Iwanicka A, Domańska-Czyż K, Rymkiewicz G. Chłoniaki o wysokiej agresywności klinicznej. *Acta Haematologica Polonica* 2009;40:125–144.

Walewski J. Chłoniak Burkitta. *Zalecenia PTOK 2013*;tom 2:916-925.

Gastwirt JP, Roschewski M. Management of adults with Burkitt lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2018;16:812-822.

van Rijk A, Mason D, Jones M, Cabeçadas J, Crespo M, Cigudosa JC, et al. Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *J Hematop.* 2008;1:119–26.

Evans PA, Pott C, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007;21:207–14.

Jaffe ES, Vardiman JW, Campo E. and Arber DA. *Hematopathology*. Edited by Elsevier. London, UK. 2011.

Wagener R, Bens S, Toprak UH, Seufert J, López C, Scholz I, Herbrueggen H, Oschlies I, Stilgenbauer S, Schlesner M, Klapper W, Burkhardt B, Siebert R. Cryptic insertion of MYC exons 2 and 3 into the immunoglobulin heavy chain locus detected by whole genome sequencing in a case of "MYC-negative" Burkitt lymphoma. *Haematologica*. 2020;Apr;105(4):e202-e205. doi: 10.3324/haematol.2018.208140. Epub 2019 May 9.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* Lyon, France: IARC Press; 2001.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th Ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

Thomas, D.A., O'Brien, S., Faderl, S. et al. Burkitt Lymphoma and Atypical Burkitt or Burkitt-like Lymphoma: Should These be Treated as Different Diseases?. *Curr Hematol Malig Rep.* 2011;6,58–66.

Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, Kreuz M, Kohler CW, Richter J, Pienkowska-Grela B, Adam P, Burkhardt B, Claviez A, Damm-Welk C, Drexler HG, Hummel M, Jaffe ES, Küppers R, Lefebvre C,

Lisfeld J, Löffler M, Macleod RA, Nagel I, Oschlies I, Rosolowski M, Russell RB, Rymkiewicz G, Schindler D, Schlesner M, Scholtysik R, Schwaenen C, Spang R, Szczepanowski M, Trümper L, Vater I, Wessendorf S, Klapper W, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma Network Project; Berlin-Frankfurt-Münster Non-Hodgkin Lymphoma Group. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood*. 2014;Feb 20;123(8):1187-98. doi: 10.1182/blood-2013-06-507996. Epub 2014 Jan 7.

Zajdel M, Rymkiewicz G, Chechlinska M, Blachnio K, Pienkowska-Grela B, Grygalewicz B, Goryca K, Cieslikowska M, Bystydziński Z, Swoboda P, Walewski J, Siwicki JK. miR expression in MYC-negative DLBCL/BL with partial trisomy 11 is similar to classical Burkitt lymphoma and different from diffuse large B-cell lymphoma. *Tumour Biol*. 2015;Jul;36(7):5377-88. doi: 10.1007/s13277-015-3203-y. Epub 2015 Feb 13.

Ferreiro JF, Morscio J, Dierickx D, et al. Post-transplant molecularly defined Burkitt lymphomas are frequently MYC-negative and characterized by the 11q-gain/loss pattern. *Haematologica* 2015;100(7):275–79.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375-2390.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised, 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017.

Havelange V, Ameye G, Théate I, Callet-Bauchu E, Lippert E, Luquet I, Raphaël M, Vikkula M, Poirel HA. The peculiar 11q-gain/loss aberration reported in a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas can also occur in a MYC-rearranged lymphoma. *Cancer Genet*. 2016;209:117-118.

Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*. 2017;Apr 5;8(4):116. doi: 10.3390/genes8040116.

Horn H, Kalmbach S, Wagener R, Staiger AM, Hüttl K, Mottok A, Bens S, Traverse-Glehen A, Fontaine J, Siebert R, Rosenwald A, Ott G. A Diagnostic Approach to the Identification of Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2021;Mar 1;45(3):356-364. doi: 10.1097/PAS.0000000000001613.

23.04.2021 BEATA GRYGALOWICZ

Data i podpis