



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di dottorato in Scienze Biomediche

Direttore Prof. Eusebio Tolu

Indirizzo Genetica Medica Malattie Metaboliche e Nutrigenomica

Responsabile Prof. Francesco Cucca

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore Prof. Andrea Montella

CITOGENETICA MOLECOLARE IN ONCOEMATOLOGIA

Tutor:

DOTT.SSA G. FOGU

Tesi di dottorato della:

DOTT.SSA FRANCESCA CAMBOSU

Direttore:

PROF. E. TOLU

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 4
1 Genetica e Cancro	Pag. 4
1.1 Neoplasie Ematologiche	Pag. 6
1.2 Neoplasie delle linee cellulari mieloidi	Pag. 11
1.2.1 Leucemia Mieloide Acuta (AML)	Pag. 14
1.2.2 Sindromi Mielodisplastiche (MDS)	Pag. 16
1.2.3 Sindromi Mielodisplastiche/Mieloproliferative (MDS/MPN)	Pag. 18
1.2.4 Sindromi Mieloproliferative (MPN)	Pag. 18
1.2.4.1 Leucemia Mieloide Cronica (CML)	Pag. 19
1.2.4.2 MPN Philadelphia negativi (MPN Ph-)	Pag. 21
<i>Policitemia Vera (PV)</i>	Pag. 22
<i>Trombocitemia Essenziale (ET)</i>	Pag. 23
<i>Mielofibrosi (MF)</i>	Pag. 23
1.3 Neoplasie delle linee cellulari linfoidi	Pag. 27
1.3.1 Neoplasie delle plasmacellule	Pag. 27
<i>Mieloma Multiplo (MM)</i>	Pag. 28
1.3.2 Leucemia Linfatica Cronica (CLL)	Pag. 29
1.3.3 Leucemia Linfatica Acuta (ALL)	Pag. 30
1.3.4 Linfomi (HL e NHL)	Pag. 31

1.4 Tipologia delle anomalie cromosomiche	Pag. 33
1.5 Targeted therapies	Pag. 36
1.6 Lavoro sperimentale	Pag. 38
2 MATERIALI E METODI	Pag. 39
2.1 Pazienti inseriti nello studio	Pag. 39
2.2 Metodiche di laboratorio	Pag. 39
2.2.1 Citogenetica Standard	Pag. 39
<i>Culture di sangue midollare e allestimento di preparati cromosomici</i>	Pag. 39
<i>Allestimento dei vetrini da culture di sangue midollare e/o periferico</i>	Pag. 40
<i>Colorazione in bande QFQ e analisi citogenetica</i>	Pag. 41
<i>Sincronizzazione cellulare e bandeggio ad alta risoluzione</i>	Pag. 42
2.2.2 Citogenetica molecolare	Pag. 42
<i>Pretrattamento dei vetrini</i>	Pag. 42
<i>Allestimento della F.I.S.H.</i>	Pag. 42
<i>Lavaggi post ibridazione</i>	Pag. 43
<i>Preparazione delle sonde da cloni BAC/PAC</i>	Pag. 44
<i>Culture batteriche</i>	Pag. 44
<i>Estrazione del DNA da culture batteriche</i>	Pag. 44
<i>Marcatura delle sonde</i>	Pag. 45
<i>Osservazione al microscopio</i>	Pag. 47
3 RISULTATI	Pag. 48

4 CONCLUSIONI	Pag. 56
5 CASI CLINICI	Pag. 57
CASO N° 1: Presenza di cromosoma dicentrico (7;9) in corso di crisi blastica linfoide di LMC	Pag. 57
CASO N° 2: Traslocazione t(9;18) in LA post-PV	Pag. 61
CASO N° 3: Mieloma Multiplo IgG-λ e traslocazione t(5;22): un'associazione casuale?	Pag. 63
CASO N° 4: Cariotipo complesso da rivalutazione di sindrome da 5q-	Pag. 66
CASO N° 5: Studio di un caso di Philadelphia mascherato	Pag. 69
Ringraziamenti	Pag. 72
Bibliografia	Pag. 72

INTRODUZIONE

1 Genetica e Cancro

Il cancro è sotto vari aspetti una malattia genetica risultato dell'espansione clonale di una singola cellula mutata che ha tratto vantaggio selettivo rispetto alle normali cellule somatiche. Nello sviluppo del cancro le mutazioni possono avvenire attraverso una sequenza di eventi mutazionali, superiore ai due accadimenti, che interessino geni specifici [1].

I geni interessati nell' oncogenesi sono diversi:

- a) Proto-oncogeni: normalmente coinvolti nella regolazione positiva (promozione) della proliferazione cellulare. Le mutazioni a carico di questi geni causano “gain of function” attivando il gene a oncogene. È sufficiente la mutazione di un singolo allele, effetto dominante, perché si abbia aumento della proliferazione cellulare.
- b) Geni onco-soppressori (Tumor Suppressor genes): in condizioni normali sopprimono la proliferazione cellulare per inibizione della divisione oppure guidando l'apoptosi. Le mutazioni in questi geni causano “loss of function”. Affinchè si abbia la manifestazione fenotipica della mutazione è necessaria la presenza di due alleli mutati, secondo un pattern mutazionale recessivo.
- c) Geni mutatori: controllano l'integrità del genoma e la fedeltà del trasferimento dell'informazione genetica.

Le alterazioni interessanti il DNA e coinvolte nell'oncogenesi possono essere di vario tipo: mutazioni puntiformi, difetti di metilazione del DNA, perdita di

eterozigosità, amplificazioni geniche, aneuploidie, anomalie cromosomiche strutturali.

In particolare le anomalie cromosomiche hanno una diversa significatività a seconda che siano “non random” oppure accadimenti casuali o ancora nel caso in cui siano anomalie primarie o secondarie. Le anomalie cromosomiche primarie sono frequentemente anomalie singole, specifiche di un particolare tumore, che si riscontrano alla diagnosi. In questo caso è possibile correlare l’anomalia cromosomica con la carcinogenesi. Le anomalie secondarie invece si trovano nel corso dell'evoluzione della patologia, in particolare nei tumori solidi. Esse non sono quindi implicate nell’origine della malattia, ma intervengono come eventi secondari capaci di condizionarne il decorso e l'evoluzione [1]. La citogenetica assume pertanto un ruolo importante come strumento implicato nella diagnosi, nell'impostazione della terapia e nella valutazione della prognosi, sia nei tumori solidi che in onco-ematologia.

La citogenetica dei tumori solidi ha avuto una evoluzione più lenta rispetto a quella delle neoplasie ematologiche a causa di diverse limitazioni tecniche quali la cattiva qualità dei preparati cromosomici; il numero di anomalie complesse acquisite durante la progressione della patologia, che spesso rende difficile l'identificazione dell'anomalia primaria; il basso indice mitotico delle cellule tumorali, che rende necessarie colture a breve termine per evitare la crescita inficiante di cellule normali [1].

In campo ematologico gli studi citogenetici si sono evoluti rapidamente grazie alla relativa semplicità di ottenimento del campione, il midollo osseo e se necessario il sangue periferico, anche se in quest’ultimo caso l'informazione ottenuta non è sempre ottimale [1].

Ai fini della classificazione di alcuni tumori è sufficiente la sola analisi morfologica, in altri invece ai fini della diagnosi e della terapia è necessaria la conoscenza delle lesioni genetiche.

Un buon esempio del significato che può avere la conoscenza di una anomalia genetica nella classificazione, diagnosi e terapia di un tumore è dato dalla Leucemia Mieloide Cronica (CML) che è stata la prima neoplasia ematologica per cui si è riscontrata la correlazione con una anomalia citogenetico-molecolare, rappresentata dal cromosoma Philadelphia (Ph). Si tratta di un cromosoma 22 apparentemente deletato, derivante dalla traslocazione reciproca $t(9;22)(q34;q11)$ che porta alla formazione di un gene di fusione BCR-ABL1 sul cromosoma 22. Il gene ibrido codifica per una tirosina-chinasi (TK) costitutivamente attivata che attiva varie pathways cellulari che influenzano la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi delle cellule neoplastiche. La proteina anormale è un bersaglio terapeutico per un inibitore delle tirosina-chinasi che ha modificato completamente la prognosi e l'aspettativa di vita di migliaia di pazienti con CML [1, 2].

1.1 Neoplasie Ematologiche

Una ideale classificazione dei tumori emopoietici dovrebbe includere patologie clinicamente significative, chiaramente definite, mutualmente esclusive una rispetto all'altra e che possano essere diagnosticate con tecnologie e informazioni correntemente a disposizione [2].

Nel 2001, l'Organizzazione Mondiale per la Sanità (World Health Organization – WHO), in collaborazione con la Society for Hematopathology e con la European

Association of Hematopathology ha cercato di combinare, per la prima volta, le informazioni genetiche con i segni clinici, morfologici, citochimici, immunofenotipici e biologici in un algoritmo diagnostico per le neoplasie mieloidi. A tale scopo venne pubblicata la Classificazione dei Tumori dei tessuti Ematopoietico e Linfoide come sezione nella 3^a edizione della WHO Classification of Tumours, con la premessa che sarebbero state necessarie future revisioni a causa della rapidità con cui emergevano nuove informazioni genetiche e biologiche [3]].

Nel 2008 questa classificazione è stata aggiornata e pubblicata come sezione della 4^a edizione della stessa classificazione WHO. Il principio della classificazione è lo stesso applicato nell'edizione precedente; il peso dei vari parametri considerati, cioè segni clinici, morfologici, immunofenotipici genetici e biologici al fine della diagnosi finale varia in funzione della malattia [2]. Nella 4^a edizione sono state aggiunte entità di recente caratterizzazione, principalmente definite da caratteri genetici, e si cerca inoltre di definire meglio i criteri diagnostici minimi di patologie emopoietiche in cui non è ben chiaro il confine tra neoplastico e pre-neoplastico [2, 3].

La classificazione WHO stratifica la patologia neoplastica emopoietica in funzione della linea cellulare coinvolta nel tumore: mieloide, linfoide, istiocitica/dendritica o ambigua, differenziando, nell'ambito di ciascuna filiera, sulla base della tipologia delle cellule coinvolte a seconda che siano dei precursori (es.: leucemia mieloide acuta, leucemia linfoblastica/linfoma) o delle cellule mature (es.: sindromi mieloproliferative, sindromi mielodisplastiche, sindromi mielodiplastico/mieloproliferative oppure linfoma a cellule B mature ecc.).

Seguono ulteriori sub-classificazioni, in particolare in ambito linfoide, sulla base dello stadio maturativo o differenziativo (es.: linfoma follicolare), della morfologia (es.: linfoma a grandi cellule B diffuse), della presentazione clinica e biologica (es.: linfoma a grandi cellule B diffuse associato a infiammazione cronica) e così via [2]. Vedi di seguito Tabella da Vardiman JW 2010.

Myeloproliferative neoplasms
Chronic myelogenous leukaemia, <i>BCR-ABL1</i> positive
Chronic neutrophilic leukaemia
Polycythaemia vera
Primary myelofibrosis
Essential thrombocythaemia
Chronic eosinophilic leukaemia, NOS
Mastocytosis
Cutaneous mastocytosis
Systemic mastocytosis
Mast cell leukaemia
Mast cell sarcoma
Extracutaneous mastocytoma
Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> or <i>FCGR1</i>
Myeloid and lymphoid neoplasms with <i>PDGFRA</i> rearrangement
Myeloid neoplasms with <i>PDGFRB</i> rearrangement
Myeloid and lymphoid neoplasms with <i>FCGR1</i> abnormalities
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms
Chronic myelomonocytic leukaemia
Atypical chronic myeloid leukaemia, <i>BCR-ABL1</i> negative
Juvenile myelomonocytic leukaemia
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
<i>Refractory anaemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis</i>
Myelodysplastic syndromes
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia
Refractory anaemia
Refractory neutropenia
Refractory thrombocytopenia
Refractory anaemia with ring sideroblasts
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia
Refractory anaemia with excess blasts
Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q)
Myelodysplastic syndrome, unclassifiable
Childhood myelodysplastic syndrome
<i>Refractory cytopenia of childhood</i>

Acute myeloid leukaemia (AML) and related precursor neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities

- AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
- AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;p22); *CBFB-MYH11*
- Acute promyelocytic leukaemia with t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*
- AML with t(9;11)(p22;q23) *MLLT3-MLL*
- AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
- AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EV1*
- AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *REB1-MLL1*
- AML with mutated *NPM1*
- AML with mutated *CEBPA*

AML with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

Acute myeloid leukaemia, NOS

- AML with minimal differentiation
- AML without maturation
- AML with maturation
- Acute myelomonocytic leukaemia
- Acute monoblastic and monocytic leukaemia
- Acute erythroid leukaemia
- Acute megakaryoblastic leukaemia
- Acute basophilic leukaemia
- Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma

Myeloid proliferations related to Down syndrome

- Transient abnormal myelopoiesis
- Myeloid leukaemia associated with Down syndrome

Elastic plasma cytotoid dendritic cell neoplasm

Acute leukaemias of ambiguous lineage

- Acute undifferentiated leukaemia
- Mixed phenotype acute leukaemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
- Mixed phenotype acute leukaemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged
- Mixed phenotype acute leukaemia, B/myeloid, NOS
- Mixed phenotype acute leukaemia, T/myeloid, NOS
- Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma*

Precursor lymphoid neoplasms

B lymphoblastic leukaemia/lymphoma

- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma, NOS
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(v;11q23); *MLL* rearranged
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1* (*ETV6-RUNX1*)
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hyperdiploidy
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hypodiploidy (hypodiploid ALL)
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) *IL3-JGH*
- B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); *E24-PAX1*

T lymphoblastic leukaemia/lymphoma

Systemic EBV positive T-cell lymphoproliferative disease of childhood
 Hydroa vacciniforme-like lymphoma
 Adult T-cell leukaemia/lymphoma
 Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type
 Enteropathy-associated T-cell lymphoma
 Hepatosplenic T-cell lymphoma
 Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
 Mycosis fungoides
 Sézary syndrome
 Primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders
 Lymphomatoid papulosis
 Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
 Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma
 Primary cutaneous CD8 positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma
 Primary cutaneous CD4 positive small/medium T-cell lymphoma
 Peripheral T-cell lymphoma, NOS
 Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
 Anaplastic large cell lymphoma, ALK positive
 Anaplastic large cell lymphoma, ALK negative
 Hodgkin lymphoma
 Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
 Classical Hodgkin lymphoma
 Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
 Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
 Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
 Histiocytic and dendritic cell neoplasms
 Histiocytic sarcoma
 Langerhans cell histiocytosis
 Langerhans cell sarcoma
 Interdigitating dendritic cell sarcoma
 Follicular dendritic cell sarcoma
 Fibroblastic reticular cell tumor
 Indeterminate dendritic cell tumor
 Disseminated juvenile xanthogranuloma
 Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
 Early lesions
 Plasmacytic hyperplasia
 Infectious mononucleosis-like PTLD
 Polymorphic PTLD
 Monomorphic PTLD (B- and T/NK-cell types)⁴
 Classical Hodgkin lymphoma type PTLD⁴

Classificazione WHO dei tumori emopoietici e linfoidi

Da: Vardiman JW. *Chemico-Biological interaction* (2010) 184: 16-20 [2]

Autorizzazione richiesta e ottenuta da Elsevier: Licenza n°2784791006439 – 09/11/2011

FRANCESCA CAMBOSU - "CITOGENETICA MOLECOLARE IN ONCOEMATOLOGIA"

TESI DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE - GENETICA MEDICA, MALATTIE METABOLICHE E NUTRIGENOMICA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

1.2 Neoplasie delle linee cellulari Mieloidi

La classificazione WHO include nel termine “mieloide” tutte le cellule derivanti dalle linee granulocitica (neutrofilo, basofilo, eosinofilo), monocitico/macrofagica, eritrocitica, megacariocitica e mast cells [3].

Le neoplasie della linea mieloide comprendono sia forme in cui si hanno essenzialmente blasti con minima o nessuna maturazione come la leucemia mieloide acuta (AML), sia forme in cui si hanno cellule in maturazione. Queste ultime si differenziano ulteriormente a seconda che ci si trovi in presenza di maturazione efficace [sindromi mieloproliferive (MPN)], maturazione inefficace associata a displasia [sindromi mielodisplastiche (MDS)] o ancora associazione di maturazione efficace e inefficace [sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative (MDS/MPN)] [2].

Uno strumento importante per classificare le neoplasie mieloidi e stimare la loro evoluzione è sempre la valutazione della percentuale di blasti presenti nei campioni di sangue periferico e/o midollare. La WHO raccomanda che tale percentuale debba essere desunta, quando possibile, da una conta su almeno 200 leucociti in uno striscio di sangue periferico e 500 cellule nucleate in uno striscio proveniente da aspirato midollare, colorati con Wright-Giemsa [3].

Una percentuale di blasti pari o superiore al 20% è considerata leucemia mieloide acuta (AML) quando si presenta de novo, evoluzione in leucemia acuta quando si riscontra pazienti con precedente diagnosi di sindrome mielodisplastica (MDS) o mielodisplastica/mieloproliferativa (MDS/MPN) o ancora trasformazione blastica in una precedente diagnosi di sindrome mieloproliferativa (MPN) [3].

Di per se il valore soglia del 20% di blasti non è una indicazione a trattare il paziente come se si fosse in presenza di AML o di trasformazione blastica. La

terapia deve infatti tener conto della valutazione clinica e di tutte le informazioni disponibili. In alcuni casi associati ad anomalie genetiche specifiche, la diagnosi di AML può essere posta indipendentemente dalla conta dei blasti nel sangue periferico o nel midollo osseo [3].

All'esordio della malattia è essenziale effettuare un'analisi citogenetica su midollo osseo per stabilire il cariotipo di base, e in seguito è raccomandato ripetere tale analisi per valutare la risposta alla terapia o una eventuale evoluzione. Sulla base dei risultati ottenuti sul cariotipo iniziale e del sospetto diagnostico, fondato su dati clinici, morfologici e immunofenotipici, possono essere richiesti ulteriori studi genetici quali FISH (Ibridazione In Situ Fluorescente) e/o RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction). Queste ulteriori analisi possono riconoscere varianti di anomalie citogenetiche ben note oppure riarrangiamenti sub-microscopici non rilevabili all'esame citogenetico convenzionale quali ad esempio il gene di fusione FIP1L1-PDGFR α in alcune neoplasie mieloidi associate a ipereosinofilia, la delezione del gene Rb nel mieloma multiplo e la delezione di P53 in una varietà di tumori, oppure mutazioni geniche che hanno un significativo valore sia diagnostico che prognostico.

Tra le tante mutazioni, la cui scoperta è sempre in aumento e molte delle quali hanno assunto importanza nell'ultima classificazione WHO, si possono citare quelle a carico di JAK2, MPL e KIT in MPN; NRAS, KRAS, NF1 e PTPN11 in MDS/MPN; NPM1, CEBPA, FLT3, RUNX1(AML1), MLL e altri in AML o ancora a carico di GATA1 nei disordini mieloproliferativi associati alla sindrome di Down.

Tuttavia, nonostante sia stato dimostrato che l'aumentata o diminuita espressione di alcuni geni influenza la prognosi di alcune neoplasie mieloidi, attualmente l'

utilizzo della RT-PCR, che consente l'analisi quantitativa di un gene, non è una pratica di routine, come non lo è l'utilizzo di arrays per lo studio dell'espressione genica. I dati relativi all'utilizzo di tali tecnologie non sono stati pertanto inseriti nella 4^a edizione della classificazione WHO.

1.2.1 Leucemia Mieloide Acuta (AML)

La leucemia mieloide acuta (AML) è una malattia clinicamente eterogenea, a eziologia ancora largamente sconosciuta, che mostra notevoli differenze nella sopravvivenza dei pazienti a seguito di intensi trattamenti chemioterapici. Essenzialmente tali differenze si basano sull'età, la morfologia dei blasti e le anomalie citogenetiche [4].

Secondo la classificazione WHO sono divise in 3 sottogruppi:

- AML con anomalie citogenetiche ricorrenti [t(8;21), inv(16), t(15;17), t(9;11), t(6;9), inv(3) ecc]
- AML con anomalie MDS correlate
- Neoplasie mieloidi Terapia-correlate

Originariamente le anomalie incluse nel sottogruppo delle AML con anomalie genetiche ricorrenti erano i riarrangiamenti dei geni (RUNX1, CBFβ, RARA e MLL) codificanti per fattori di trascrizione e associate a segni clinici e morfologici completamente diversi.

Nella 3^a edizione della classificazione si è giustamente valutato che la presenza di lesioni genetiche multiple (non solo anomalie cromosomiche numeriche o strutturali ma anche mutazioni geniche submicroscopiche) contribuisce allo sviluppo del processo leucemico influenzandone le caratteristiche morfologiche e cliniche [3].

La continua scoperta di un gran numero di nuovi fattori prognostici ha consentito una migliore comprensione della biologia della malattia e lo sviluppo di nuovi targets terapeutici, in particolar modo per i casi di AML con citogenetica normale (circa il 45% dei casi). In questi ultimi sono stati identificati molti fattori nuovi prognostici quali mutazioni del gene FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3 con

significato sfavorevole), NPM1 (nucleophosmin 1), e CEBPA (CCAAT enhancer-binding protein- α ; con significato favorevole) [4, 5].

I riarrangiamenti a carico dei geni codificanti per fattori di trascrizione possono portare a ridotta/anomala maturazione di una o più linee mieloidi; le mutazioni di geni che codificano per proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale possono essere necessarie per la proliferazione o sopravvivenza del clone neoplastico [3].

I markers clinici e genetici sono quindi fondamentali nella valutazione dei pazienti con AML e hanno un ruolo critico nella gestione clinica.

La citogenetica rimane il più importante fattore prognostico malattia-correlato e consente di identificare le seguenti categorie di rischio:

Basso rischio: caratterizzate da $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)/t(16;16)(p13;q22)$, $t(15;17)(q22;q11\sim 21)$, Mut NPM1 o CEBPA in pazienti con citogenetica normale in assenza di FLT3-ITD;

Rischio intermedio: rappresentano il gruppo con il più ampio numero di pazienti e maggiormente eterogeneo. Reperti frequenti sono: citogenetica normale, trisomia 8 (+8), $t(9;11)(q22;q23)$, $t(3;5)(q25;q34)$ e, dal punto di vista molecolare, mutazioni di NPM1 o CEBPA in pazienti con cariotipo normale normale in assenza di FLT3-ITD;

Alto rischio in cui si può riscontrare caritipo complesso con numero di anomalie >3 , $-5/5q-$, $-7/7q-$, anomalie 11q23 (MLL) diverse da $t(9;11)(q22;q23)$, $inv(3;3)(q21q26.2)$, $t(6;9)$, $t(9;22)$, anomalie (17p) [4, 6].

1.2.2 Sindromi Mielodisplastiche (MDS)

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo di disordini emopoietici eterogeneo da un punto di vista clinico, biologico e morfologico. La patogenesi, non ancora ben definita, sembra far seguito a complessi cambiamenti nella biologia della cellula staminale emopoietica pluripotente che portano a ematopoiesi inefficace e displastica. Nei pazienti si riscontra citopenia periferica accompagnata a ipercellularità midollare e aumentato rischio di evoluzione in leucemia mieloide acuta (AML).

Le MDS colpiscono per lo più soggetti adulti, con un'età media di insorgenza di 65-70 anni, con una prognosi variabile e un range di sopravvivenza da poche settimane o pochi mesi fino a più di 10 anni dalla diagnosi.

Le MDS possono essere primitive o secondarie a trattamenti radio e/o chemioterapici per altre patologie (MDS terapia correlate, t-MDS); in quest'ultimo caso la prognosi è peggiore rispetto a quella delle MDS primitive [7].

In MDS si riscontra una profonda eterogeneità anche a livello genetico infatti si può repertare un' enorme variabilità di anomalie citogenetiche spesso molto rare che rendono difficile la comprensione del background molecolare delle anomalie stesse e conseguentemente il loro valore prognostico. La principale caratteristica genetica è rappresentata da una eccedenza di anomalie sbilanciate in cui si riscontra con maggiore frequenza la perdita di materiale genetico sotto forma di delezioni parziali e/o monosomie, mentre sono più rare le trisomie parziali o totali che portano a guadagno di materiale genetico. Da quanto detto si può quindi assumere che il meccanismo molecolare fondamentale nelle MDS è rappresentato dalla perdita o inattivazione di geni oncosoppressori; mentre l'attivazione di oncogeni sembrerebbe meno rilevante. Circa il 50% dei pazienti

mostrano anomalie cromosomiche clonali e le più frequenti sono: -5/5q-, -7/7q-, +8 e 20q- [8].

Attualmente i pazienti con MDS vengono diagnosticati secondo criteri istopatologici ben definiti. Secondo la WHO il criterio minimo per la diagnosi di MDS è il reperto nel midollo osseo di almeno il 10% delle cellule con sicura displasia in almeno una linea mieloide.

La presenza di un'anomalia cromosomica clonale può aiutare a porre diagnosi di MDS in quei pazienti in cui la sintomatologia clinica e i reperti laboratoristici sono a favore della diagnosi ma la morfologia cellulare non è dirimente [3].

La prognosi è stabilita secondo una classificazione che include la valutazione morfologica, la percentuale di blasti e le caratteristiche cliniche e molecolari quali la citopenia periferica e la citogenetica. Un esempio di tale tipo di classificazione è rappresentato dall' International Prognostic Scoring System (IPSS) creato da Greendberg et al a metà degli anni '90 che stratifica i pazienti in basso rischio (low e intermediate-1) e alto rischio (intermediate-2 e high). Negli ultimi anni però si è fortemente cercato di sviluppare nuovi sistemi prognostici per le MDS quali il WPSS cioè PSS basato sulla classificazione WHO che comprende le caratteristiche morfologiche secondo WHO, la citogenetica secondo IPSS e il fabbisogno trasfusionale: l'aumentata necessità di trasfusioni di eritrociti sembra essere un fattore prognostico negativo. Quest'ultima scala di valutazione ha portato a identificare cinque classi di rischio [9] riassunte come segue:

Molto Basso: presenza di del(11q) e monosomia 7;

Basso: interessa il n° più alto di pazienti,. Si riscontrano cariotipo normale, del(5q), del(12p), del(20q);

Intermedio: in cui si riscontrano del(7q), trisomia 8, i(17q), trisomia 19 o 21 o altre eventuali anomalie singole;

Alto: in cui si possono riscontrare anomalie a carico del cr. 3, -7/7q-, doppie anomalie o cariotipo con 3 anomalie;

Molto alto: caratterizzate da cariotipo complesso con numero di anomalie >3.

1.2.3 Sindromi Mielodisplastiche/Mieloproliferative (MDS/MPN)

Le sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative (MDS/MPN) sono patologie che presentano sintomi e caratteristiche delle MDS quali diseritropoiesi e disgranulopoiesi, ma anche delle MPN come granulocitosi periferica, monocitosi, eosinofilia o trombocitosi.

In questa categoria sono comprese: Leucemia Mielomonocitica Cronica (CMML), Leucemia Mielomonocitica Giovanile (JMML), Leucemia Mieloide Cronica Atipica, BCR-ABL negativa (aCML) e MDS/MPN non classificabili [10].

1.2.4 Sindromi Mieloproliferative (MPN)

Le sindromi mieloproliferative (MPN) sono disordini clonali dei precursori emopoietici a seguito dei quali si ha alterata proliferazione di cellule mature e/o immature della linea mieloide associata a leucocitosi periferica, trombocitosi o notevole aumento dei globuli rossi [11]. Si tratta di condizioni che mostrano la tendenza alla progressione in fibrosi midollare e/o alla trasformazione in leucemia acuta.

Nel 1951 Dameshek ipotizzò una classificazione di disordini che appaiono correlati dal punto di vista fisiopatologico e che per primo definì “disordini mieloproliferativi”. Questo gruppo di disordini comprendeva la Leucemia Mieloide Cronica (LMC), la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (TE), la Mielofibrosi Idiopatica (MFI) e l'Eritroleucemia (Sindrome di Di Guglielmo) [10, 12].

Negli anni l'eritroleucemia è stata ridefinita come leucemia acuta eritroide

Nel 2001 la classificazione delle neoplasie mieloidi da parte della World Health Organization (WHO) includeva i disordini mieloproliferativi già indicati da Dameshek nella più ampia categoria dei disordini mieloproliferativi cronici (CMPDs) comprendente anche la leucemia neutrofila cronica (CNL) e la leucemia eosinofila cronica/sindrome ipereosinofila (CEL//HES), mentre la leucemia mieloide cronica è ormai un'entità separata caratterizzata dalla presenza della traslocazione $t(9;22)(q34;q11)$.

Nel 2008 la classificazione WHO è stata ulteriormente aggiornata, con l'aggiunta di Mast Cell Diseases (MCD), MPN non classificabili e l'inserimento di una nuova categoria: Neoplasie mieloidie linfoidi associate a eosinofilia e anomalie di PDGFRA, PDGFRB e FGFR1. La denominazione di leucemia eosinofila cronica/sindrome ipereosinofila (CEL//HES) veniva modificata in CEL-NOS (not otherwise specified) [10].

1.2.4.1 Leucemia Mieloide Cronica (CML)

La leucemia mieloide cronica (CML) è un disordine clonale delle cellule staminali emopoietiche caratterizzata dall'accumulo nel sangue periferico e nel midollo

osseo di granulociti a differenti stadi di maturazione. La caratteristica peculiare dal punto di vista genetico è il riscontro del cromosoma Philadelphia all'analisi del cariotipo e del gene di fusione BCR/ABL1 all'analisi molecolare.

Il cromosoma Philadelphia (Ph), scoperto nel 1961 e identificato inizialmente come una delezione del cr. 22, è in realtà un piccolo cromosoma derivante dalla traslocazione reciproca tra una porzione del braccio lungo del cromosoma 9 e una porzione del braccio lungo del cromosoma 22 identificata nel 1973 (Rowley) e definita dal punto di vista citogenetico come $t(9;22)(q34;q11.2)$.

Il cromosoma Philadelphia è presente in circa il 95% dei casi di CML di cui rappresenta il marker citogenetico, ma si ritrova anche nel 25-30% delle leucemie linfatiche acute (ALL) e nel 2% circa delle leucemie mieloidi acute (AML).

Il gene di fusione deriva dalla fusione di parte del proto-oncogene ABL (dal nome dello scopritore Abelson), il cui locus è mappato in 9q34, con parte della regione BCR (breakpoint cluster region) sul cromosoma 22 in corrispondenza della banda q11.2. Il gene chimerico sul cromosoma derivativo 22 5'BCR-3'ABL è sempre espresso (mentre 5'ABL-3'BCR sul derivativo 9, può essere o meno espresso). Frutto del trascritto di fusione sono tre diverse proteine chimeriche (p190, p210, p230) correlabili con diverse forme cliniche. Le tre proteine di fusione BCR-ABL hanno potenziale oncogenico e sono responsabili del processo leucemico a seguito dell'incremento dell'attività tirosin-chinasica citoplasmatica che causa la attivazione costitutiva dei segnali RAS, cui seguono aumento proliferativo delle cellule, inibizione dell'attività apoptotica e anormalità dei processi di adesione cellulare.

La patologia è clinicamente eterogenea, probabilmente a seguito dei tre breakpoints variabili nel gene BCR (Major-bcr, minor-bcr e micr-bcr) e/o di

anomalie cromosomiche secondarie ma circa il 5% dei riarrangiamenti Philadelphia sono varianti; il cromosoma Ph può risultare mascherato e la traslocazione può essere rivelata solo dalla FISH o da analisi molecolari.

Le varianti possono essere *semplici* se coinvolgono il segmento del cromosoma 22 e un altro cromosoma diverso dal 9; oppure *complesse*, quando sono coinvolti tre o più cromosomi, in questo caso il gene di fusione BCR-ABL può essere riscontrato in siti cromosomici diversi da 22q11.2. La formazione di queste varianti può far seguito a due diversi meccanismi [13]:

- 1-step in cui secondo alcuni autori più rotture avvengono contemporaneamente in 3 o 4 cromosomi
- 2-step in cui invece si ha una sequenzialità di eventi e alla normale traslocazione t(9;22) fa seguito una seconda traslocazione coinvolgente altri cromosomi. Questo potrebbe suggerire una evoluzione clonale e quindi essere correlato a prognosi più negativa.

1.2.4.2 MPN Philadelphia negativi (MPN Ph-)

Spesso nelle MPN è presente deregolazione di una tirosina-chinasi che mima le vie di segnale indotte dai recettori per le citochine emopoietiche (esempio tipico BCR-ABL) [14]. Sono collegate a mieloproliferazione le anomalie che coinvolgono geni per i recettori dei fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGFRA e PDGFRB), del recettore-1 per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR1) e il gene JAK2 (Janus Kinase 2).

A seguito della scoperta di mutazioni ricorrenti a carico di JAK2 la classificazione delle MPN come i criteri di diagnosi e le prospettive terapeutiche hanno subito una radicale revisione. A ciò ha contribuito la scoperta di mutazioni a carico di altri geni quali il recettore per la trombopoietina (TPO) MPL, CBL coinvolto nell'ubiquitinazione di vari recettori per i fattori di crescita; ASXL1, coinvolto in varia maniera nel rimodellamento della cromatina [14]; TET2, facente parte di una famiglia di tre geni (TET1, TET2, TET3) talora coinvolti nella leucemogenesi, che partecipa in maniera attiva o passiva ai processi di demetilazione del DNA [14].

Per quanto riguarda la citogenetica, la presenza di anomalie clonali al cariotipo varia notevolmente tra i diversi disordini mieloproliferativi Philadelphia negativi. Il più alto numero di anomalie del cariotipo si riscontra in PMF (circa il 40% dei casi) seguita da PV (circa 35%) mentre in ET tale reperto è estremamente raro (<5%). L'anomalia di più frequente riscontro è la trisomia 8 seguita dalla trisomia 9; altre anomalie ricorrenti sono del(13q) e del(20q) e trisomie parziali del cromosoma 1. Più raramente si possono riscontrare: +19, +21, -7, -Y, del(12p), i(17q), e altrettanto rare sono le traslocazioni bilanciate [15].

Policitemia Vera (PV)

La Policitemia Vera (PV) è un disordine clonale acquisito delle cellule staminali emopoietiche caratterizzata da eritropoiesi anomala in cui alcuni progenitori eritroidi diventano eritropoietina (EPO) o interleukina-3 (IL3) ipersensibili e citochine indipendenti. Dal 2005 è nota l'anomalia molecolare peculiare della patologia: la mutazione JAK2V617F, che si riscontra in circa il 90% dei pazienti [15, 16]. La proteina JAK2 media le vie di segnale di vari recettori emopoietici

compresi EPO e TPO ed è inoltre coinvolto nelle vie di segnale che interessano i recettori con attività tirosin-chinasica. Essa è quindi coinvolta nella regolazione della proliferazione, della differenziazione ed di eventi anti-apoptotici. La mutazione JAK2 1849G>C risulta in una sostituzione di una Valina con una Fenilalanina nel codone 617 nel dominio JH2 (JAK homology 2), la proteina mutata che ne deriva è fosforilata e attiva vie di segnale citochine indipendenti o ipersensibili [16].

Dal punto di vista citogenetico la PV mostra come anomalia più frequente la trisomia del cromosoma 9 o del braccio p dello stesso cromosoma, seguita da trisomia 8, del(20q) del(13q) e del(1p).

Trombocitemia Essenziale (ET)

La trombocitemia essenziale (ET) è caratterizzata da persistente trombocitosi ($> 450 \times 10^9/L$). il cui decorso clinico è caratterizzato dalla tendenza alla trombosi e ad emorragie con il rischio a lungo termine di evolvere in disordini mieloidi aggressivi, mielofibrosi e/o leucemia acuta. Anche in questo caso il marker genetico-molecolare è rappresentato dalla mutazione JAK2 V617F [18].

In questo tipo di patologia come già detto è raro il riscontro di anomalie citogenetiche quali trisomia 8, trisomia 9 e del(13q).

Mielofibrosi (MF)

La mielofibrosi (MF) è un disordine clonale delle cellule staminali emopoietiche che può presentarsi “de novo” (PMF) o nell’evoluzione di altri disordini

mieloproliferativi (es.: post-PV MF, post-ET MF). La clinica mostra anemia talora marcata e trasfusione-dipendente, marcata splenomegalia che a volte necessita di splenectomia, fibrosi del midollo osseo e mielopoiesi extramidollare. La terapia corrente comprende il trapianto allogenico di cellule staminali in pazienti ad alto rischio; la terapia farmacologica non sembra modificare la storia naturale della patologia ma è in grado di alleviare l'anemia e la splenomegalia in circa il 20% dei pazienti.

La mutazione causativa della malattia è sconosciuta ma in circa il 50% dei casi è descritta la mutazione JAK2 V617F già citata in precedenza [19].

Alla citogenetica possono riscontrarsi: del(13q) e del(20q), trisomia parziale del braccio lungo cromosoma 1, +8 e +9.

Riarrangiamenti cromosomici noti - patologia correlati

Anomalia cromosomica	Geni	Patologia
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL	CML, ALL
t(8;21) (q22;q22)	AML/ETO	AML M2 Mieloblastica
t(15;17)(q22;q21)	PML/RARA	AML M3 Promielocitica
inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q32)	CBFB/MYH11	AML M4
t(9;11)(p22;q23)	MLL/AF9	AML M5
t(6;11)(q27;q23)	MLL/AF6	AML M4, M5

Continua

Inv(3)(q21q26) o t(3;3)(q21;q26)	EVI1/RPN1	AML M1,M4, M6
t(6;9)(p23;q34)	DEK/CAN	AML M2, M4
+11, riarrangiamenti cr. 11	MLL, ATM	AML, MDS, ALL, CLL
-5/5q- (5q31-5q33)		MDS, AML
-7/7q- (7q22-7q35)		
+8		MDS, AML
-20/20q-		
Iso(17q)		
+9, Riarrangiamenti 9(q24)	JAK2	MPN, Linfomi
del(12p) riarrangiamenti (12p)	TEL_ETV6	MDS, CLL
-17/17p-	TP53 (17p13)	MDS, AML, MM, CLL
Riarrangiamenti 14q32	IGH	MM, Linfomi
del(13q14)	Rb1	MM, PV
t(11;14)(q13;q32)	IGH/CCND1	MM,Linfomi
t(4;14)(q16.3;q32)	IGH/FGFR3	
t(14;16)(q32;q23);	IGH/c-maf	
t(8;14)	MYC/IGH	
t(14;18)(q32;q21);	IGH/BCL2	Linfomi

t(2;18)	IGK/BCL2	Linfomi
t(18;22)(;q21);	BCL2/IGL	

1.3 Neoplasie delle linee cellulari linfoidi

Nella classificazione WHO aggiornata nel 2008 sono state adottate linee guida per la definizione di alcune patologie già note quali la Leucemia Linfatica Cronica (CLL), la Macroglobulinemia di Waldenström e le neoplasie plasmacellulari, sono stati aggiunti i linfomi cutanei ed è stato rivisitato il “grading” dei linfomi follicolari mentre sono state ben definite alcune categorie di linfomi a cellule T (T-cell Lymphomas) che includono le enteropatie associate a T-cell Lymphoma, linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) e linfoma subcutaneo panniculitis-like.

1.3.1 Neoplasie delle plasmacellule

Le neoplasie delle plasma cellule comprendono il Mieloma Multiplo (MM) e le patologie da deposizione di Immunoglobuline. Nella 3^a edizione della classificazione WHO dei tumori la definizione Plasma Cell Myeloma (PMC) comprendeva le gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS), lo smoldering mieloma. Nell'aggiornamento del 2008 non ci sono raccomandazioni per modificare la definizione di MGUS mentre si è preferito definire smoldering mieloma e mieloma indolente come PMC asintomatico [21].

La diagnosi di PMC, in assenza di danno d'organo mieloma correlato richiede la presenza di una siero proteina M pari a 30g/L oppure di una componente plasmacellulare nel midollo osseo pari al 10% (mieloma asintomatico). I casi che non rispondono a queste caratteristiche sono considerati MGUS. Quando invece ci si trova di fronte a danno d'organo mieloma-correlato si pone diagnosi di PMC

se si riscontra una proteina-M nel siero o nelle urine una percentuale di plasmacellule nel midollo osseo superiore al 10%.

Mieloma Multiplo (MM)

Il mieloma multiplo è una malattia causata dall'accumulo clonale di plasma cellule (precursori B linfocitari). La presentazione clinica è caratterizzata da anemia, ipercalcemia e lesioni litiche delle ossa [22]. Rappresenta circa l'1% di tutti i tumori umani e approssimativamente il 10% delle neoplasie ematologiche ed è caratterizzato da estrema variabilità nella sopravvivenza, da pochi mesi nei pazienti con manifestazioni extramidollari (es.: leucemia plasmacellulare primaria) a decine di anni in pazienti asintomatici. La sopravvivenza può essere prolungata con la chemioterapia convenzionale, anche associata a trapianto di cellule staminali ematopoietiche e trattamenti con i così detti “nuovi farmaci” (thalidomide, lenalidomide, bortezomib) [23].

Il genoma delle plasmacellule maligne è caratterizzato da estrema instabilità, per cui presenta aneuploidie e anomalie numeriche e strutturali anche in combinazione e che si riflette in un' estrema variabilità fenotipica. Le anomalie ricorrenti, presenti talora anche nella fase premaligna MGUS, includono monosomie totali o parziali del cromosoma 13, anomalie a carico del braccio lungo del cromosoma 1, inattivazione o delezione del gene p53 e riarrangiamenti a carico del gene per le catene pesanti delle immunoglobuline IgH (14q32) che danno origine a diverse traslocazioni: t(4;14), t(8;14), t(11;14), t(14;16), con conseguente fusione con diversi geni partner [22, 23].

1.3.2 Leucemia Linfatica Cronica (CLL)

La leucemia linfatica cronica è la neoplasia ematologica più frequente nel mondo occidentale ed è caratterizzata da un decorso clinico ampiamente variabile: alcuni pazienti hanno sintomatologia lieve o assente, non necessitano di terapie e hanno normali aspettative di vita; altri muoiono presto [23].

L'International Workshop sulle CLL ha proposto i nuovi criteri diagnostici per questa patologia ponendo come requisito per la diagnosi il reperto di una componente monoclonale B superiore a $5,0 \times 10^9/L$ associata a immunofenotipo CLL nel sangue periferico in assenza di sintomi correlati alla patologia o citopenia o coinvolgimento di tessuti diversi dal midollo. In presenza di linfadenopatia o splenomegalia, a seguito di CLL infiltrante, associata al reperto nel sangue periferico di $< 5,0 \times 10^9/L$ si parla di small linfoma linfocitico (SLL) [21].

In anni relativamente recenti sono stati individuati approcci terapeutici altamente efficaci e potenzialmente curativi come l'uso combinato di chemioterapia e anticorpi o il trapianto allogenico di cellule staminali.

Molti progressi nella comprensione della patogenesi e nella previsione dell'evoluzione sono stati raggiunti grazie alla diagnostica molecolare che ha individuato alcuni markers utili per stratificare i pazienti per diverse opzioni terapeutiche.

La caratteristica citogenetica è di avere un basso indice mitotico che può essere aumentato facendo uso di mitogeni appositi (es.: LPS o TPA) e con questo metodo si possono riscontrare anomalie nel 40-50% dei casi, fra le quali le più comuni sono la trisomia 12 e anomalie a carico di 13q14. Grazie all'utilizzo della

FISH si possono individuare diversi riarrangiamenti genomici e i più ricorrenti oltre a quelli già citati sono delezioni in 6q, 11q e 17p [23].

1.3.3 Leucemia Linfatica Acuta (ALL)

La leucemia linfoblastica acuta può essere considerata un modello di applicazione della diagnostica molecolare alla patologia onco-ematologica perchè per la diagnostica di questa malattia sono state ampiamente utilizzate immunofenotipizzazione, biologia molecolare, citogenetica convenzionale e molecolare. La caratterizzazione immunofenotipica è diventata indispensabile per assegnare le leucemia a una specifica linea cellulare di precursori B o T [23].

In base a quanto detto si distinguono:

- Pro-B-ALL che rappresenta circa il 10% delle ALL dell'adulto, è associata a negatività all'antigene CD10 e nel 70% dei casi a riarrangiamenti nel gene MLL (11q23). La prognosi è negativa.
- ALL comune e pre-B-ALL, CD10+ raggruppate insieme perché non ci sono sostanziali differenze nelle caratteristiche della patologia e nell'evoluzione. Rappresentano circa il 60% delle ALL dell'adulto e oltre l'80% di quelle del bambino.
- T-ALL hanno la caratteristica di coesprimere antigeni mieloidi, ma sono rare leucemie bifenotipiche o con due linee cellulari. Negli studi sulle ALL infantili sono considerate come fattore di rischio intermedio o alto e necessitano di trattamenti intensivi.

All'analisi citogenetica si possono riscontrare riarrangiamenti a carico del gene MLL che è coinvolto in traslocazioni con più di 50 geni partner e t(12;21) TEL-ETV6/AML1. Sono poi presenti iperdiploidia, t(9;22) associata prevalentemente alla proteina chimerica p190 (70-80% adulti, 80-90% infanzia) e t(4;11) MLL-AF4.

1.3.4 Linfomi (HL e NHL)

I linfomi originano dal sistema linfatico e la diagnosi è considerata generalmente difficile e prona ad errori e anche in questo caso si devono considerare i segni clinici, morfologici, immuno-fenotipici e genetici. La classificazione dei linfomi adottata rapidamente nel 2001 per alcuni trials clinici è stata modificata nella revisione 2008 della classificazione WHO; i cambiamenti hanno interessato la valutazione di parametri età e sito-specifici e la migliore definizione delle caratteristiche della sovrapposizione biologica tra Linfoma di Hodgking e linfoma a grandi cellule B (DLBCL) e ancora della linea di confine tra DLBCL e linfoma di Burkitt. Sono poi stati definiti meglio i linfomi a cellule T.

In generale possono essere suddivisi in due grandi categorie: linfomi di Hodgking (HL) linfomi Non-Hodgking (NHL).

Già da tempo sono state individuate traslocazioni cromosomiche non-random correlate a diversi linfomi.

I NHL, comprensivi di diversi sottotipi, sono associati a traslocazioni cromosomiche coinvolte nel processo di linfomagenesi in qualità di eventi primari: t(8;14) e le sue varianti t(2;8) e t(8;22) in linfoma di Burkitt, t(11;14) nel linfoma mantellare, t(14;18) nel linfoma follicolare. I geni spesso interessati nei

riarrangiamenti sono P53(17p13), CCND1(BCL1)(11q13), IgH(14q32) e BCL2(18q21)

I linfomi di Hodgking sono classificati in due sottotipi e all'analisi citogenetica, quando è informaiva, presentano cariotipi molto diversi rispetto ai NHL. Sono caratterizzati da elevata instabilità cromosomica associata a tri e tetra-ploidia, aneuploidie multiple e riarrangiamenti complessi. Alcuni breakpoints sono non-random e interessano ad esempio 1p/1q, 2p/2q, 3q26-28, 4q25-35, 6q13-24 ed altri cromosomi. Spesso si riscontrano "gains" di materiale cromosomico in 2p13-16 o in 9p24 [23].

1.4 Tipologia delle anomalie cromosomiche

Le anomalie cromosomiche riscontrate nei tumori possono essere classificate in 4 tipi, a seconda delle loro conseguenze.

Il tipo I si riferisce a traslocazioni o altri riarrangiamenti strutturali che portano a fusione di due geni, con formazione di un gene ibrido. Questa fusione porta alla sintesi di proteine chimeriche, che acquistano un potenziale oncogeno. Questi geni ibridi sono tumore-specifici, come ad es. il gene di fusione ABL/BCR nella LMC e FLI1-EWS che si forma in seguito alla traslocazione $t(11;22)(q24;q12)$ nel sarcoma di Ewing [24]. Queste anomalie possono essere considerate alla stregua di “guadagno di funzione”. I geni implicati spesso coinvolgono fattori di trascrizione ma anche tirosin-chinasi. Le traslocazioni bilanciate, con conseguente formazione di geni chimerici, rappresentano spesso la via principale per identificare i geni coinvolti nel cancro attraverso il clonaggio posizionale. Parecchi geni coinvolti in fusioni sono spesso associati con diversi partners, i quali a loro volta possono fondersi con altri geni.

Il tipo II comprende i casi di disregolazione di un gene per effetto di posizione. Il paradigma è rappresentato dal linfoma di Burkitt, caratterizzato dalla traslocazione $t(8;14)(q24;q32)$ o sue varianti, quali la traslocazione $t(2;8)(p12;q24)$ o la traslocazione $t(8;22)(q24;q11)$. Il gene MYC, localizzato in 8q24, è disregolato in quanto per effetto della traslocazione viene posto sotto il controllo dell'enhancer delle catene pesanti delle immunoglobuline, localizzato in 14q32.

Il tipo III consiste in guadagno di materiale genetico

Questo tipo di alterazione è molto frequente, e può coinvolgere interi cromosomi o porzioni di essi come risultato di riarrangiamenti strutturali sbilanciati. Anche in

questi casi siamo di fronte a guadagno di funzione di oncogeni localizzati nei cromosomi soprannumerari o nei tratti trisomici .

Il sottotipo IIIa corrisponde ad amplificazione genica, che è un aumento selettivo di numero di copie di specifiche sequenze di DNA. Si possono riscontrare due aspetti citogenetici: cromosomi “double minute”(DM), che si autoreplicano e sono presenti nelle cellule in numero variabile di copie, generalmente alto, e regioni a colorazione omogenea (HSR homogeneously staining regions) dove copie multiple di una regione genomica sono integrate nei cromosomi sotto forma di blocchi di ampliconi ripetuti. L'amplificazione può coinvolgere una serie di oncogeni, la cui sequenza non sembra modificata, come nel caso di ERBB2, MICN, CCND1, GLI, MDM2, ALK.

Il tipo IV corrisponde alla perdita di informazione genetica sia attraverso delezione o traslocazione sbilanciata, o attraverso altri meccanismi che portano a perdita di eterozigosità (LOH), compresa la disomia uniparentale acquisita, sia essa completa o segmentale. In questo gruppo rientrano anche mutazioni puntiformi che inattivano un gene. Si tratta per lo più di geni oncosoppressori, quali i geni Rb, RET, BRCA1, P53 o di geni coinvolti nei processi di riparo del DNA [24].

Tipologia delle anomalie	Anomalia	Effetto su geni interessati
Tipo I	Geni di fusione originati da traslocazioni o altri riarrangiamenti	Gain of function su oncogeni, fattori di trascrizione, chinasi

Continua

Tipo II	Effetto di posizione conseguenza di traslocazioni e riarrangiamenti	Disregolazione di oncogeni e altri geni
Tipo III	Guadagno di copy number su interi cromosomi o parte di essi	Effetto dose su oncogeni e altri geni
Tipo IIIa	Amplificazione genica >2-4 copie per set aploide	Effetto dose su oncogeni e altri geni
Tipo IV	Parziali o totali: perdite di cr. o isodisomie. Inattivazione	Loss of function, LOH in geni omcosoppressori

Tabella riassuntiva della tipologia di anomalie

1.5 Targeted therapies

Le anomalie cromosomiche hanno permesso di mettere a punto terapie specifiche per diversi tipi di tumori. Esempi classici sono rappresentati dalla LMC e dalla Leucemia acuta promielocitica.

Nella LMC la proliferazione maligna è causata dalla costituzionalmente attivata tirosin-chinasi BCR-ABL. Questa proteina è codificata dal gene ibrido BCR-ABL che si forma per effetto della traslocazione $t(9;22)(q34;q11)$ che porta alla formazione del cromosoma Philadelphia.

L'Imatinib fu identificato nel corso di una valutazione di farmaci anti proteina C. Durante questi studi alcuni ricercatori osservarono che una particolare modificazione della molecola base induceva un'azione anti-tirosinchinasica (Fig. 1).

Ulteriori modificazioni portarono alla formulazione di un farmaco che fu usato per la prima volta su un paziente nel 1998, con risultati strepitosi.

Un altro esempio di terapia mirata è rappresentato dall'acido trans retinoico (ATRA), utilizzato nella terapia della leucemia acuta promielocitica con traslocazione $t(15;17)$ prima ancora che si conoscessero le basi molecolari della malattia. La traslocazione risulta nella fusione del gene PML (Promyelocytic leukemia gene) localizzato in 15q22 con il gene RARA (retinoic acid receptor) localizzato in 17q21. La proteina chimerica codificata dal gene 5'PML-RARA3' (sul cr. 15) è un abnorme recettore dell'acido retinoico, con un effetto dominante sul normale gene RARA, che antagonizza il processo di differenziazione dei promielociti legandosi a dei corepressori e causando inibizione trascrizionale.

L'ATRA compete con i corepressori dissociandoli dalla proteina di fusione (PML/RARA). Questa funge da attivatore dei geni acido retinoico dipendenti e si attiva la maturazione cellulare.

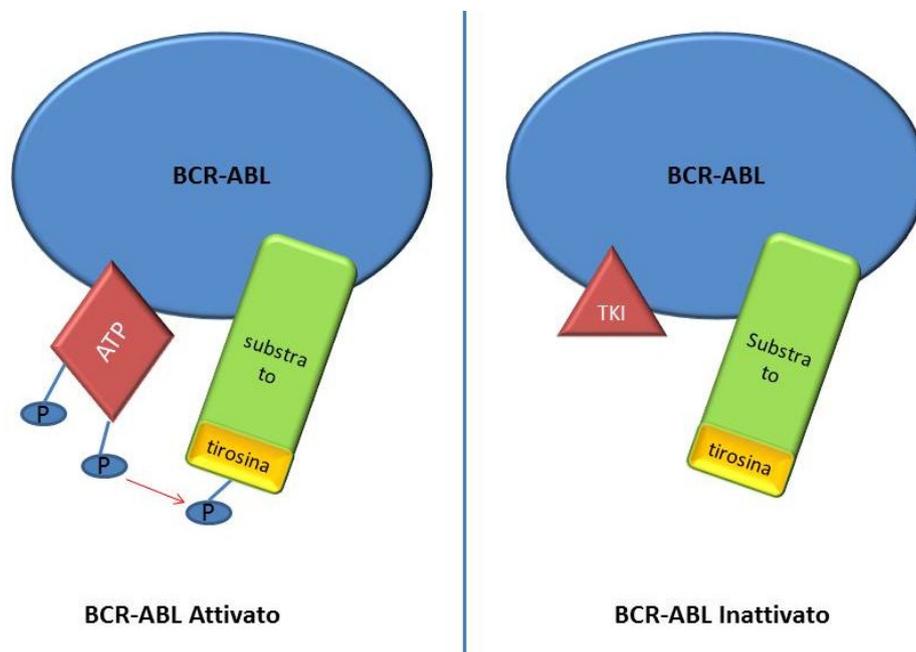


Fig. 1 – Esempio di meccanismo d'azione di un farmaco: inibitori delle tirosin-chinasi (Imatinib, Desatinib)

1.6 Lavoro sperimentale

Presso il Centro di Genetica Clinica dell'Università di Sassari è operante, già dal 1981, un laboratorio di Citogenetica, sia prenatale che post-natale, che a partire dal 1985 ha attivato il settore “citogenetica oncoematologica”. Abbiamo limitato l'analisi della casistica riportata in questa tesi agli anni 2000-2011 in quanto la conservazione dei campioni eventualmente ammissibili a una rivalutazione citogenetico-molecolare ha avuto inizio soltanto a partire dal 2000.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di operare una revisione della casistica, anche al fine di inserire l'attività del Centro in studi collaborativi italiani ed europei su specifiche patologie, in particolare sulle sindromi mielodisplastiche, ed inoltre di operare una rivalutazione citogenetica dei casi pregressi rimasti non completamente risolti in base alla sola citogenetica standard.

Presso il nostro laboratorio la FISH è entrata nella routine sia della citogenetica costituzionale che delle neoplasie secondo il seguente protocollo:

- a) Inserimento di opportune analisi di FISH nella valutazione citogenetica all'esordio della malattia;
- b) Inserimento della FISH negli esami di controllo post-terapia per la valutazione della malattia residua minima (MRM) o di eventuale evoluzione del cariotipo;
- c) valutazione retrospettiva di pazienti con diagnosi citogenetica incompleta per inadeguatezza delle metodiche convenzionali.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Pazienti inseriti nello studio

La valutazione della casistica generale si riferisce alle analisi su pazienti oncoematologici eseguite presso il nostro Centro dal 1/01/2000 al 31/10/2011

La casistica delle analisi di FISH raccoglie i casi dal 1/01/2008 al 31/10/2011, compresi i casi pregressi rivalutati per motivi di ricerca

Sono inoltre riportati, a titolo di esempio, i casi clinici più interessanti giunti alla nostra osservazione.

2.2 Metodiche di laboratorio

2.2.1 Citogenetica standard

Culture di sangue midollare e allestimento di preparati cromosomici

Il sangue midollare prelevato mediante puntato sternale o da cresta iliaca in provetta eparinata, dopo diluizione in liquido di Turk e conta in camera contaglobuli al fine di aggiustare l'entità dell'inoculo a $1,5 \times 10^6$ cellule/ml, veniva messo in coltura senza stimolazione per 24 h e sincronizzato a 48 o 72h.

Di routine, presso il nostro laboratorio si utilizza il terreno Chromosome Medium M (Celbio), già completo di siero e glutammina, cui vengono addizionati antibiotici (penicillina a 100 U.I./ml e streptomina a 100 µg/ml finali). Le colture così allestite sono incubate a 37°C in incubatore a CO₂.

Un'ora prima del termine delle colture si aggiunge il colcemid alla concentrazione finale di 0,1 µg/ml e si procede quindi all' harvesting secondo le metodiche usuali. Le cellule raccolte mediante centrifugazione a bassa velocità sono sottoposte a trattamento ipotonico con KCl 0,075 M per 20' a temperatura ambiente, quindi centrifugate e sospese in un primo fissativo rappresentato dalla miscela Metanolo/Acido acetico 4:1, quindi risospese nel secondo fissativo, rappresentato dalla miscela Metanolo/Acido acetico 3:1. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione viene sospeso in un volume variabile (da 0,5 a 1 ml) di fissativo fresco e utilizzato immediatamente per l'allestimento dei vetrini, o conservato in frigorifero per brevi periodi, o in freezer per periodi più lunghi.

Allestimento dei vetrini da colture di sangue midollare

Fra le varie tecniche per l'allestimento dei vetrini era utilizzata di routine la tecnica dello spreading su vetrini asciutti, che comporta i seguenti passaggi: i vetrini portaoggetto in vetro molato vengono immersi in alcool etilico al 96%; dopo 10' vengono asciugati bene con un panno morbido e lasciati all'aria per 10-15'. Il pellet ottenuto alla fine del processo viene sospeso accuratamente in un volume opportuno di fissativo fresco (generalmente 0,5-1 ml), quindi 3 gocce della sospensione cellulare vengono fatte cadere da un'altezza di 1-2 cm lungo il vetrino (una di seguito all'altra). L'espansione della goccia viene assecondata muovendo il vetrino con delicatezza; quando il fissativo è completamente evaporato, il vetrino viene agitato vicino alla fiamma becco Bunsen in modo da farlo asciugare perfettamente e quindi viene osservato al microscopio in contrasto di fase. In base a questa osservazione se la densità cellulare non è ottimale, viene aggiustata concentrando o diluendo la sospensione cellulare utilizzata per lo

striscio e la qualità può essere migliorata ripetendo i passaggi in fissativo. I vetrini utilizzati per la FISH, allestiti secondo la metodica descritta, vengono inondati, dopo la completa espansione della goccia, con pochi ml di una miscela di Metanolo/Acido acetico nel rapporto di 4:1. Questo passaggio addizionale consente di eliminare eventuali residui di citoplasma che, sul vetrino ibridato e successivamente rilevato con fluorocromi, possono dar luogo ad una fluorescenza aspecifica che costituisce, nella fase di osservazione, un fastidioso “rumore di fondo”.

N.B.: ove necessario si è proceduto a colture di sangue periferico, seminando 0,5-1ml di sangue in 10 ml di T.C. e quindi usando procedendo come per il sangue midollare

Colorazione in bande QFQ e analisi citogenetica

Per l'analisi di routine dopo almeno 24h dall'allestimento, i vetrini venivano colorati in una soluzione di mostarda di chinacrina (Sigma) alla concentrazione dello 0,005% in tampone fosfato 0,068 M a pH 6,8 per 25', quindi lavati e montati nel medesimo tampone con vetrino coprioggetto saldato lungo i margini con smalto per unghie. L'osservazione era eseguita su fotomicroscopio Olympus BX-41 e BX-61, utilizzando il filtro per la chinacrina. Dopo aver eseguito l'analisi su 15 metafasi, come avviene di routine, l'allestimento dei cariogrammi era eseguito con il software per la cariotipizzazione automatica in dotazione con i microscopi Olympus.

Sincronizzazione cellulare e bandeggio ad alta risoluzione

Le colture di sangue midollare venivano sincronizzate utilizzando il sistema Synchroset (Celbio), secondo le istruzioni fornite dalla Ditta

2.2.2 Citogenetica molecolare

Pretrattamento dei vetrini

I vetrini vecchi di 1-3 giorni, oppure invecchiati su piastra riscaldata a 60°C per 1h, venivano trattati mediante un passaggio in 2X SSC per 15' a temperatura ambiente, disidratati attraverso una serie ascendente di alcoli (da alcool etilico al 50% ad alcool etilico assoluto), quindi asciugati all'aria e utilizzati immediatamente.

Allestimento della FISH

Tutte le sonde commerciali venivano utilizzate secondo la metodica consigliata dalla ditta produttrice.

Sui vetrini venivano caricati 5 µl di sonda in corrispondenza dell'area sulla quale era stata depositata la sospensione cellulare. La goccia veniva ricoperta con "coprioggetto" di vetro di [2×2 cm] e fatta espandere premendo delicatamente, quindi chiusa con rubber cement.

L'ibridazione avveniva mediante codenaturazione per 5' a 73°C e successiva incubazione a 37°C overnight nell'apposito dispositivo Hybrite (Abbot/Vysis) in

ambiente umido creato utilizzando carta bibula bagnata inserita negli appositi canali.

Lavaggi post ibridazione

I lavaggi post ibridazione sono stati mantenuti costanti per tutti i tipi di sonda utilizzati e consistono in:

lavaggio stringente a 72°C in 0,4X SSC addizionato di Nonidet P40 allo 0.3% per 2';

lavaggio rapido in 2X SSC addizionato di Nonidet P40 allo 0.1% a temperatura ambiente;

lavaggio rapido in PBS 1X

lavaggio rapido in H₂O

montaggio del vetrino asciugato all'aria nell'apposito DAPI/Mountig 0,125 µg/ml (Celbio)

osservazione al microscopio (Olympus BX-61 con software dedicato).

Per gli esperimenti di FISH venivano utilizzate le sonde indicate nel seguente elenco:

- Sonde commerciali per la citogenetica onco-ematologica specifiche per geni di fusione o delezioni note;
- Sonde commerciali non specifiche per l'oncoematologia ma utili per la caratterizzazione di anomalie cromosomiche e/o cariotipi complessi:

Whole Chromosome Painting (WCP); Chromosome Enumeration Probes(CEP)/alphoid probes per le regioni centromeriche; sonde Subtelomeriche;

- Sonde BAC fornite dal Children'S Hospital Oakland Research Institute (C.H.O.R.I) di Oakland in California.

Preparazione delle sonde da cloni BAC/PAC

Culture batteriche

Per la crescita dei batteri è stato utilizzato terreno LB autoclavato contenente bactotryptone, estratto di lievito, NaCl, (bacto)agar per la preparazione delle piastre, cloramfenicolo (12,5 µg/l)

Le colture sono state fatte crescere per circa 16 ore a 37°C in continua agitazione.

Estrazione del DNA da colture batteriche

Il DNA plasmidico è stato estratto mediante lisi alcalina secondo il metodo MiniPrep Maniatis [25] modificato, utilizzato di routinere sp il nostro Centro e che può essere schematizzato come segue:

- le colture da 1,5 ml fresche dopo essere cresciute over-night (16-18h) vengono centrifugate a 12000 rpm per 2' quindi il pellet ottenuto si risospende in 100 µl di una soluzione contenente glucosio 50 mM, EDTA 10 mM, TRIS-HCl 25 mM pH 8.0 addizionata di 1 µl RNAsi (10 mg/ml) per ogni ml di soluzione d'uso;

- a ciascuna tubo si aggiungono 200 μ l di una soluzione con NaOH 0,2M + SDS all'1%, quindi si mescola gentilmente per inversione;
- dopo 3' vengono aggiunti 150 μ l di una soluzione contenente K 3M e Acetato 5M
- dopo centrifugazione alla massima velocità per 5', il surnatante viene trasferito in nuovi tubi (passaggio ripetuto in caso di soluzione non limpida);
- il DNA viene quindi precipitato con 2 volumi di etanolo assoluto, mescolato gentilmente e lasciato incubare per 30' a temperatura ambiente;
- dopo centrifugazione a 13000 rpm per 5', al pellet viene aggiunto alcool etilico al 70% freddo. Si centrifuga a 13000 rpm per 20' e si rimuove il surnatante;
- dopo centrifugazione a 12000 rpm per 5', si rimuove il surnatante e il pellet così ottenuto viene asciugato a T.A., quindi risospeso in un opportuno volume di TE 10:1;
- il campione viene quantificato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% e quindi conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

Marcatura delle sonde

Le sonde sono state marcate con Biotina-16-dUTP (Biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate) oppure con Tetrametil-Rodamina-5-dUTP (Tetramethylrhodamine-5-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate), mediante "nick-translation" secondo la seguente metodica: una molecola di DNA a doppio

filamento viene digerito parzialmente con l'enzima DNAsi che taglia i legami fosfodiesterici tra due nucleotidi in posizioni casuali, lasciando delle interruzioni ("nicks") su entrambi i filamenti. Interviene quindi un secondo enzima: la DNA polimerasi I che possiede attività sia esonucleasica che endonucleasica in direzione 5'-3'. La DNA polimerasi si lega in corrispondenza del "nick", rimuove i nucleotidi grazie alla sua attività DNAsica e nello stesso tempo inizia la neo-sintesi di DNA, sostituendo la porzione di DNA rimossa con nuovi nucleotidi. Ciò avviene in opportune condizioni ed in presenza di nucleotidi trifosfati in soluzione; la timidina è parzialmente sostituita da Tetrametil-Rodamina-5-dUTP o Biotin-16-dUTP. Tetrametil-Rodamina-5-dUTP da una marcatura diretta che consente di visualizzare la sonda marcata subito dopo aver effettuato i lavaggi post ibridazione come per le sonde commerciali premarcate con fluorocromi. La biotina funge da aptene, rilevabile dopo ibridazione con anticorpi coniugati con un fluorocromo (Streptavidina-CY3 o Streptavidina FITC).

Dopo la marcatura il DNA viene precipitato con DNA umano a Cot-1, DNA di sperma di salmone, Na Acetato NaCl a concentrazione finale 250 mM e 3 volumi di alcool etilico 96% freddo (a -20°C), lasciato a -80°C per 30' e centrifugato a 15000 rpm per 20' a 4°C.

Il pellet viene lavato in alcool etilico al 70%, quindi fatto asciugare a 37°C per 30' e sciolto in un volume opportuno di mix di ibridazione costituito da formamide al 50% in 2X SSC e destran solfato al 10%.

Osservazione al microscopio

Le mitosi e i nuclei interfascici, selezionati a piccolo ingrandimento, venivano osservati con l'obiettivo ad immersione e l'interposizione dei filtri per RED/GREEN, FITC, TEXAS RED, ORANGE, AQUA.

3 RISULTATI

Come riportato nell'istogramma in fig. 2 dal 4/01/2000 al 31/10/2011 sono stati analizzati 2367 campioni suddivisi per anno e per tipo di patologia.

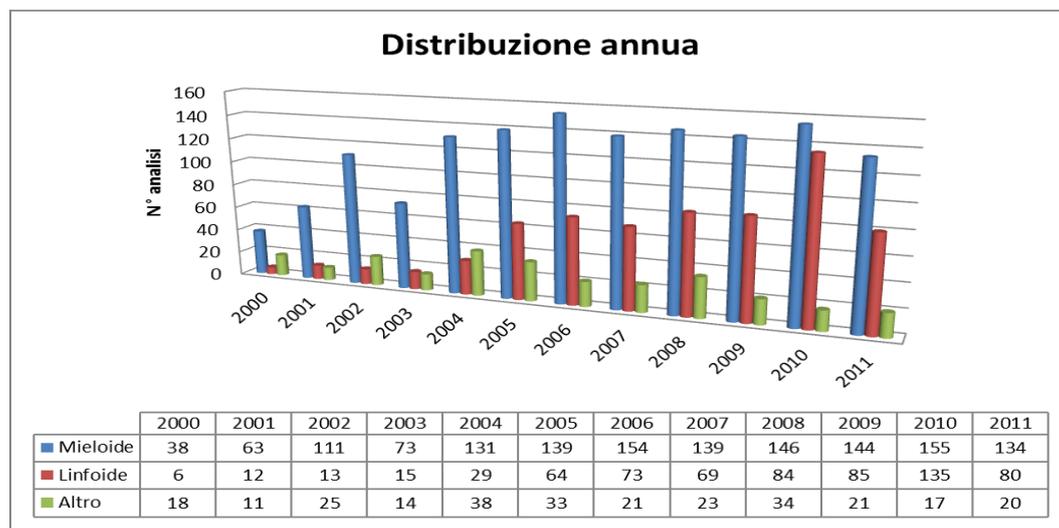


Fig. 2

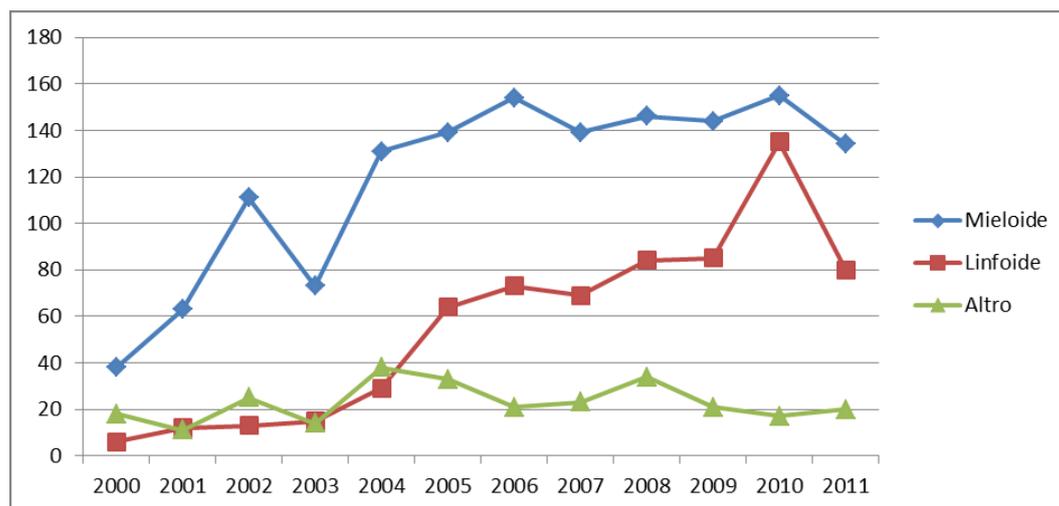


Fig. 3

Sia dall'istogramma che dal grafico in fig. 3 si può apprezzare un notevole incremento di richieste totali, da 62 nel 2000 a 234 nei primi 10 mesi del 2011. Particolarmente evidente è l'incremento per patologia linfoide, per la quale riscontriamo un aumento di circa 13 volte al 31/10/2011 (fig. 4). Questo dato è correlato non tanto a un aumento dell'incidenza della patologia linfoide nella popolazione in esame quanto piuttosto all'inserimento dell'analisi citogenetica nel protocollo diagnostico di patologie quali le gammopatie monoclonali di incerta origine o altre condizioni considerate a rischio neoplastico e sinora non sottoposte sistematicamente a valutazione citogenetica.

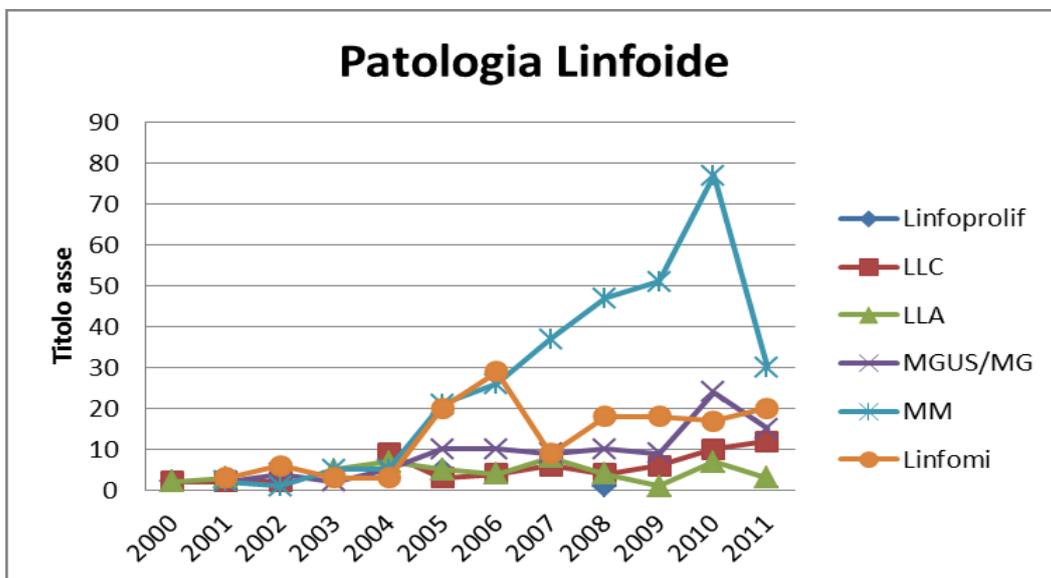


Fig 4

In fig. 5a è riportata la ripartizione per patologia a partire dal 2000 e si nota, come già dai precedenti grafici, che il numero maggiore di richieste (60%) è quello per le patologie della linea mieloide.

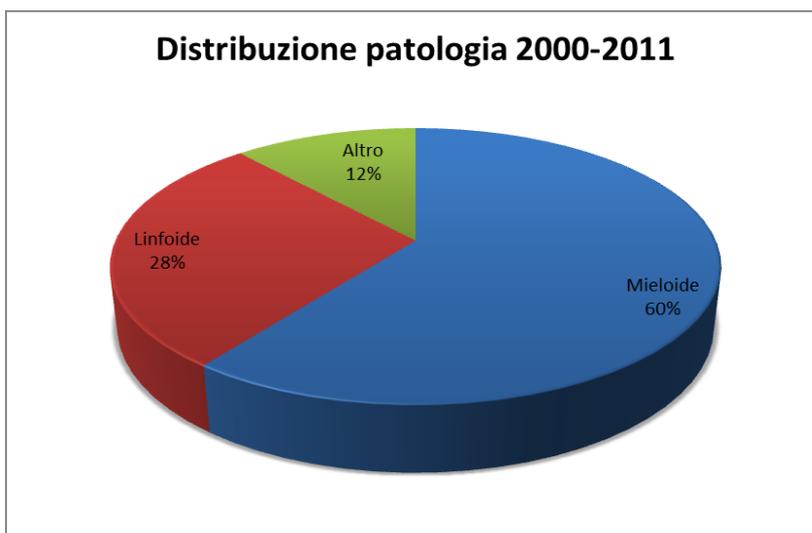


Fig. 5a

Se si va a guardare nel particolare l'incidenza dei diversi tipi di patologia (fig 5b e 5c) all'interno della divisione per linee cellulari si nota che nella patologia mieloide (fig.5b) le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono quelle più ampiamente rappresentate (33%), seguite dalle richieste per CML (25%).

Il numero di richieste per i disordini mieloproliferativi (tutte le tipologie assommano al 17%) equivale a quello delle leucemie acute (16%).

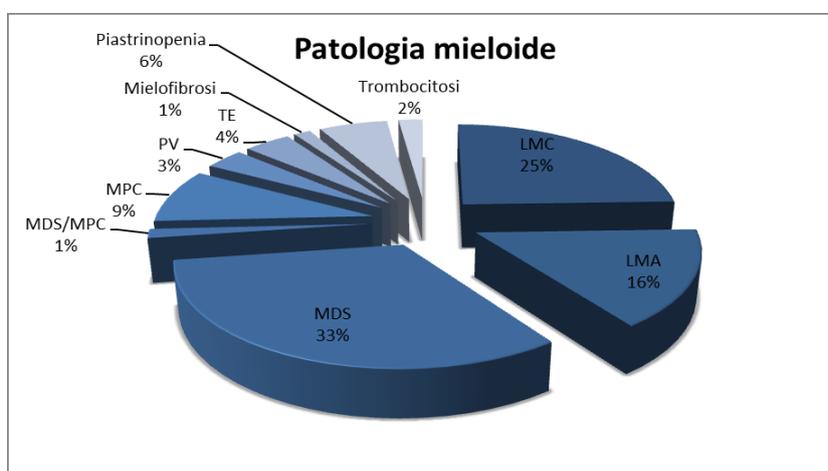


Fig. 5b

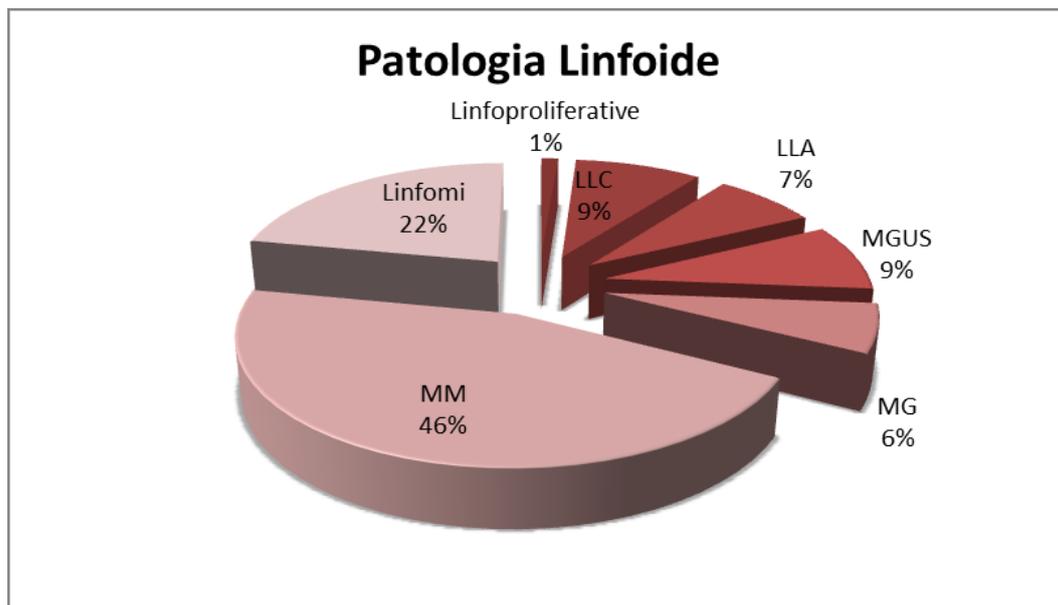


Fig. 5c

Per quanto riguarda la patologia linfoide, come già detto in precedenza, circa la metà dei casi che giungono alla nostra attenzione è rappresentata dal Mieloma Multiplo (46%), seguiti dai linfomi (22%) e dalle gammopatie monoclonali, che rappresentano il 15%

L'incidenza di anomalie cromosomiche è riportata per i casi analizzati dal 2008 al 2011.

Nel totale delle analisi effettuate il 14% mostrano cariotipo patologico e l'11% risultano essere fallite per assenza o pessima qualità delle metafasi.

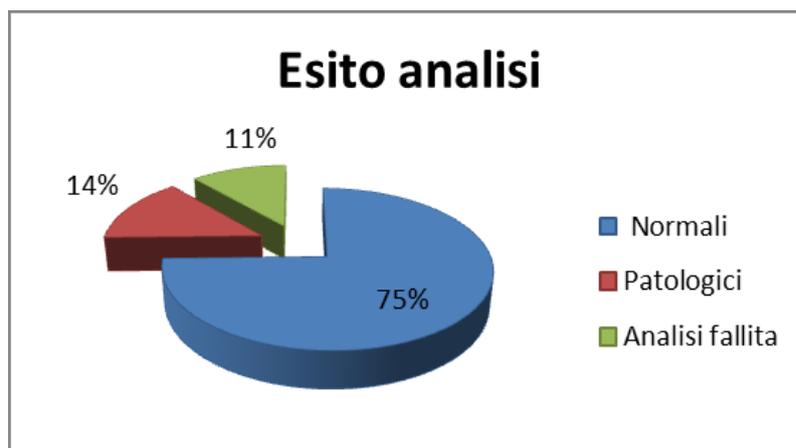


Fig. 6a

La proporzione fra le tre classi di esiti si mantiene pressochè costante nel corso degli anni (fig 6b). In particolare la percentuale di analisi fallite si attesta intorno al 10%, che rappresenta un valore soglia non ulteriormente comprimibile e connesso sostanzialmente alla qualità del campione di partenza.

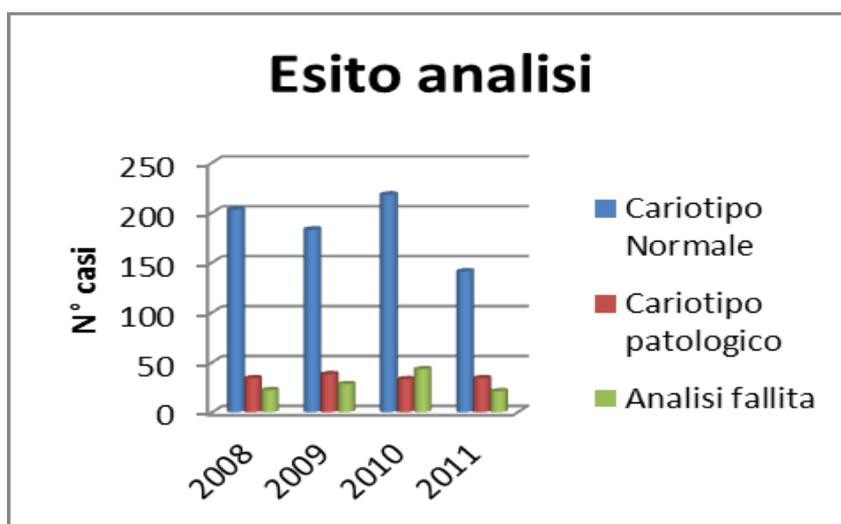


Fig. 6b

Concentrando l'attenzione, ancora una volta, sulla divisione per tipo di patologia (figg 7a, 7b; 8a, 8b) si può notare in entrambi i casi un'elevata percentuale di cariotipi normali. Questo riscontro è spiegabile assumendo come premessa alcune considerazioni:

- nella patologia di tipo mieloide, in cui peraltro il reperto di cariotipi patologici è pari al 20%, è più facile il riscontro di cariotipo normale perchè la nostra valutazione è fatta sul numero di analisi e non sul numero di pazienti. Le analisi comprendono quindi sia gli esordi, verosimilmente con esito patologico, sia le analisi di controllo post-terapia, con esito normale in pazienti rispondenti al trattamento;
- nella patologia linfoide il reperto di normalità citogenetica è spesso dovuto alla scarsa tendenza delle cellule della linea linfoide a dare mitosi spontanee in coltura per cui la maggior parte delle mitosi che vengono analizzate provengono da cellule non neoplastiche, con cariotipo normale. E' questo in particolare il caso del Mieloma multiplo, dove cellule neoplastiche proliferanti si riscontrano solo nelle fasi avanzate della malattia.

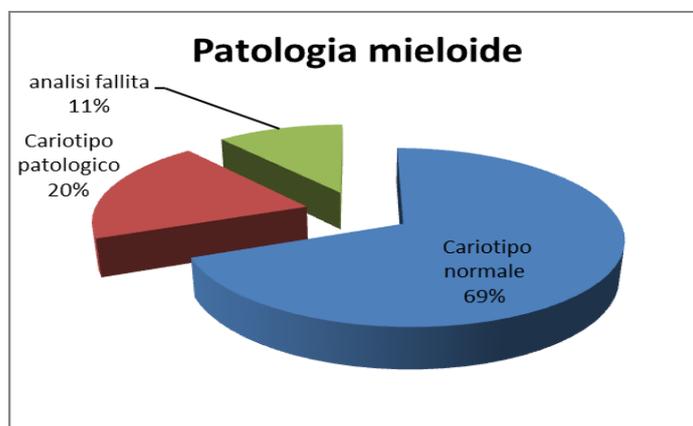


Fig. 7a

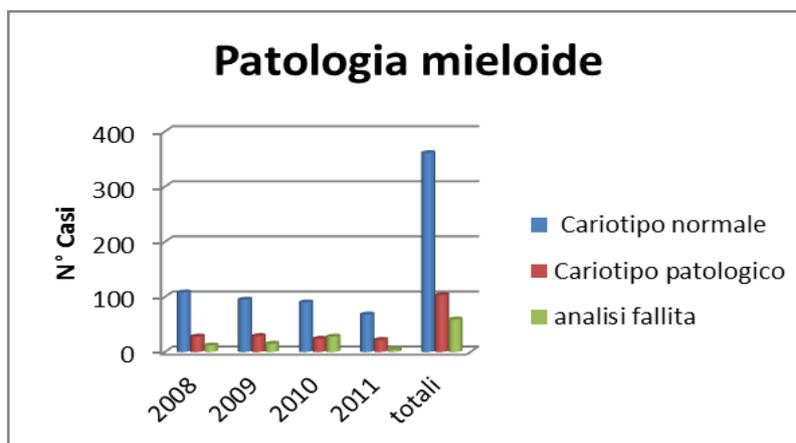


Fig. 7b

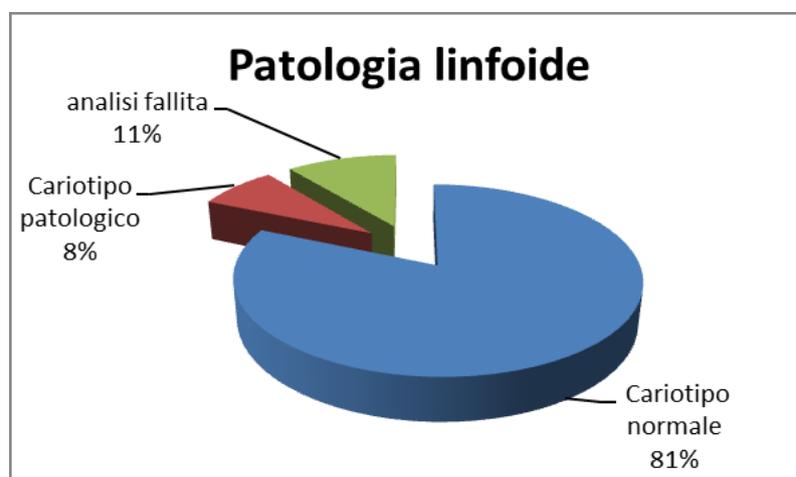


Fig. 8a

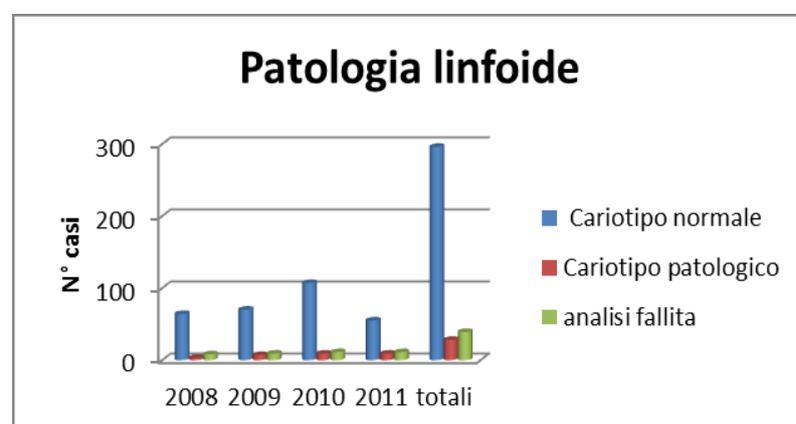


Fig. 8b

Nella fig. 9 sono riportate le analisi di FISH eseguite dal 2008 al 2011, suddivise per anno e per sospetta patologia cromosomica. Le classi più rappresentate sono, come atteso, le FISH per delezione 13q14 per il mieloma multiplo nell'ambito della patologia linfoproliferativa e per traslocazione t(9;22) per leucemia mieloide cronica nell'ambito della patologia mieloproliferativa. Interessante è anche l'elevata frequenza di FISH con sonde per painting (WCP in cui il picco più elevato è nel 2009), utilizzate nella definizione di riarrangiamenti complessi coinvolgenti più cromosomi e per la caratterizzazione di cromosomi marcatori.

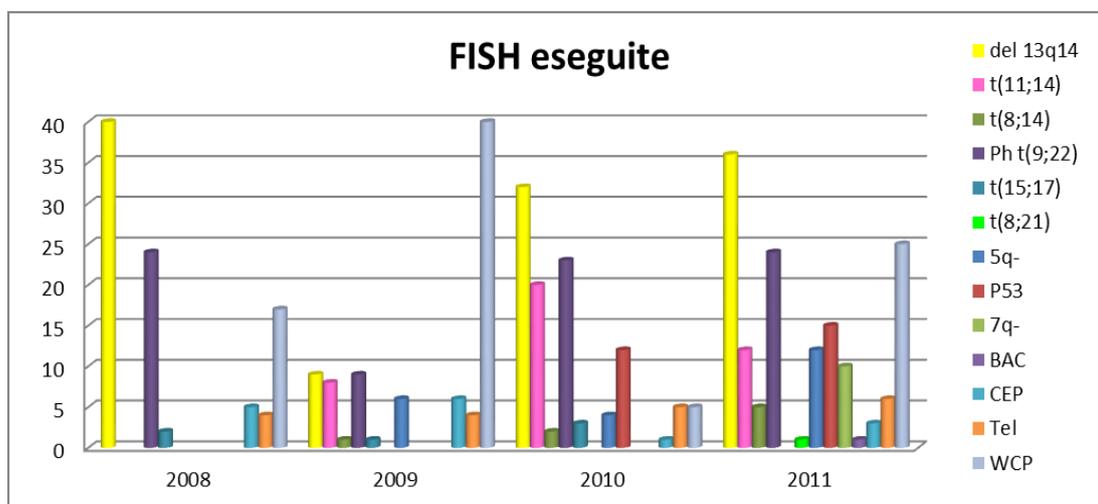


Fig. 9 – FISH eseguit e dal 2008 al 2011

Anche le FISH con sonde subtelomeriche, non particolarmente rappresentate nella nostra casistica, hanno lo scopo di caratterizzare piccoli riarrangiamenti terminali non evidenziabili con sonde per painting. Le analisi di FISH con sonde BAC, eseguite principalmente nel 2011, hanno lo scopo di caratterizzare a fini di ricerca riarrangiamenti a carico di singoli geni implicati in specifiche patologie. È questo il caso del gene PAX5, implicato nella patogenesi delle LLA, soprattutto dell'infanzia, indagato mediante FISH in uno dei casi presentati in questa tesi e

del gene JAK2, coinvolto in mutazioni o riarrangiamenti con altri geni nelle patologie mieloproliferative. Per quanto riguarda quest'ultimo gene, è in corso presso il nostro laboratorio un'indagine retrospettiva su tutti casi di sindrome mieloproliferativa esaminati a partire dal 2000, condotta mediante FISH con sonda BAC comprendente il gene al fine di valutare eventuali riarrangiamenti criptici o amplificazioni.

4 CONCLUSIONI

Da quanto ampiamente illustrato nella parte introduttiva risulta evidente che la comprensione dei meccanismi biologici implicati nell'origine e nella progressione delle neoplasie ha importanti ricadute cliniche, in termini di diagnosi, di terapia e in generale di management del paziente oncologico. L'avvento di metodologie innovative, quali le tecniche di FISH e di CGH, consente oggi di definire non solo le anomalie ormai classiche, ma anche cariotipi complessi e anomalie criptiche. Nel nostro Centro la messa a punto delle tecniche di FISH ha consentito non soltanto di migliorare lo standard della diagnostica citogenetica delle neoplasie ematologiche, ma anche di approfondire lo studio di casi di interesse scientifico, dei quali in questa tesi vengono riportati alcuni esempi.

5 CASI CLINICI

Caso N° 1: Presenza di cromosoma dicentrico (7;9) in corso di crisi blastica linfoide di LMC.

Paziente di sesso maschile, nato nel 1929, giunto alla nostra osservazione nel 2005 con la diagnosi di Leucemia mielode cronica.

Dati ematologici alla diagnosi: Emoglobina (Hb) 11.8 g/L, globuli bianchi (WBC) 230000/mmc, piastrine (Plt) 225000/mmc.

Analisi Molecolare: BCR/ABL p230 positiva in BM and PB. Terapia: Imatinib

Maggio 2010: terapia Hydroxyurea più Dasatinib. Riscontro della mutazione puntiforme T315I di BCR/ABL (associata a resistenza agli inibitori della Tirosin Chinasi)

Gennaio 2011: crisi blastica linfoide di LMC. Hb 9.1 g/L, WBC 65000/mmc (blasti 80%), Plt 5400/mmc. Immunofenotipo su blasti da SVP: CD10+ CD19+ CD34+, negativi tutti gli altri markers. Decesso nell'Aprile in seguito a perforazione intestinale.

Citogenetica

La prima analisi su aspirato midollare, eseguita all'esordio della malattia, nel 2005, era fallita a causa della mancanza di metafasi, così come l'analisi successiva, eseguita nel marzo del 2010. Il primo risultato citogenetico era ottenuto nel novembre 2010, quando la citogenetica standard dimostrava la presenza di traslocazione t(9;22), senza alcuna anomalia aggiuntiva, in 40 su 41 metafasi esaminate. Durante la crisi blastica su preparati da sangue periferico veniva evidenziato un corredo cromosomico a 45 cromosomi, con assenza di un

cromosoma 7 e di un cromosoma 9 normali e presenza di un derivativo di traslocazione $t(7;9)$. Il cromosoma Ph da traslocazione $t(9;22)$ era tuttora presente. Studi successivi con $wcp(7)$ and $wcp(9)$ e con specifiche sonde centromeriche CEP(7) and CEP(9) dimostravano che il cromosoma riarrangiato era un dicentrico derivato da traslocazione $t(7;9)$, con punti di rottura sul braccio corto di entrambi i cromosomi. Analisi di FISH con sonda BCR/ABL dual color dual fusion dimostravano la presenza di un segnale corrispondente ad ABL sul cromosoma 9 normale, di un segnale BCR sul cromosoma 22 normale e di un unico segnale di fusione sul *derivative(22)*. L'assenza del segnale di fusione sul *derivative(9)*, che è il cromosoma implicato nella formazione del $dic(7;9)$, indicava una delezione del gene di fusione ABL/BCR sul cromosoma 9.

A questo punto abbiamo condotto uno studio retrospettivo su tutti i campioni pervenuti al laboratorio sin dall'esordio; FISH interfasiche con la sonda BCR/ABL dual color dual fusion dimostravano che la delezione ABL/BCR era presente sin dall'esordio della malattia, dato questo che concorda con quanto già riportato in letteratura sull'origine delle delezioni del *derivative(9)*, che avverrebbero contestualmente alla traslocazione $t(9;22)$. Al contrario, studi di FISH interfascica con l'utilizzo simultaneo delle sonde centromeriche di entrambi i cromosomi CEP(7) e CEP(9), marcate con diversi fluorocromi, dimostravano la presenza del dicentrico solo nell'ultimo campione. Questi risultati ci portano a concludere che il $dic(7;9)$ è un'anomalia secondaria, strettamente legata alla crisi blastica linfoide.

Discussione

La traslocazione $dic(7;9)$ è un'anomalia non random in ALL, sinora riportata in 46 pazienti [26, 27, 28] perlopiù affetti da LLA di tipo B. Il dicentrico era anomalia singola in 25 pazienti; nella restante quota il dicentrico era parte di

cariotipi complessi, associato a varie anomalie aggiuntive, fra le quali il cromosoma Philadelphia, segnalato in 9 pazienti. La formazione del dicentrico (7;9) avviene con parziale perdita di 7p e 9p, con breakpoints indicati in 7p11~13 e 9p11~13 rispettivamente secondo la citogenetica standard. Lavori recenti sembrano suggerire l'esistenza di punti di rottura preferenziali sul cromosoma 9, che determinerebbero delezioni terminali di 9p di circa 38,7Mb, estese quindi da 9p11.3 a 9pter [29]. Questa regione ospita diversi geni, fra i quali il gene oncosoppressore CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), e PAX5 (paired Box 5). CDKN2A è stato dimostrato deletato nel 53,5% di casi di ALL BCR-ABL positivi, la maggior parte dei quali (87,5%) ha anche delezioni del gene IKZF1 (IKAROS family zinc finger 1) che mappa in 7p12.2 e codifica per una proteina implicata nell'attivazione della trascrizione in precursori B e T [30]. Il gene PAX5 è essenziale per il commitment verso la linea B linfocitaria e risulta deletato in oltre il 30% di ALL dell'infanzia e nel 51% dei casi di LLA BCR-ABL positivi. Sembra quindi ragionevole ipotizzare che la contemporanea perdita di IKZF1 e PAX5, che avviene nella formazione del dic(7;9), sia il principale meccanismo patogenetico responsabile della proliferazione linfoide nelle ALL di tipo B e nelle crisi blastiche B-linfoidi in corso di LMC [30, 31].

Nel nostro paziente esperimenti di FISH con le sonde BAC RP11-243F8 e RP11-344B23 che coprono il gene PAX5 hanno dimostrato che il gene risulta deletato nel dic(7;9). L'esiguità del campione non ci ha consentito di testare la presenza del gene IKZF1, che presumiamo deletato in accordo con quanto riportato in letteratura.

Aspetti interessanti del caso riportato riguardano:

- la caratterizzazione della traslocazione t(9;22) come t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)t(9;22)del(9)(q34q34)(ABL1-,BCR-),der(22)t(9;22)(BCR+,ABL+)

- la caratterizzazione mediante FISH del *derivative*(7;9) come dic(7;9)
- la dimostrazione citogenetico-molecolare della perdita del gene PAX5

Abbiamo inoltre acquisito un dato non segnalato nei casi di cromosoma Ph associato a cromosoma dicentrico (7;9) sinora riportati in letteratura: il coinvolgimento nel dicentrico (7;9) del cromosoma 9 derivativo di t(9;22) e non del cromosoma 9 normale.

Lo studio riportato ci permette di tracciare una ragionevole storia clinica del nostro paziente: all'inizio il paziente manifestava una classica LMC Ph positiva, con scarsa risposta alla terapia dovuta alla presenza della mutazione T315I, che conferisce resistenza agli inibitori delle tirosin-chinasi. A questo si aggiunge un altro fattore prognostico sfavorevole, rappresentato dalla traslocazione t(9;22) con delezione ABL/BCR [32, 33, 34].

La successiva traslocazione dic(7;9), avvenuta con perdita di geni coinvolti nel normale differenziamento di cellule linfoidi, in particolare del gene PAX5, in un clone di cellule staminali Ph positivo determinava la crisi blastica linfoide.

Caso N° 2: Traslocazione t(9;18) in LA post-PV

Paziente di sesso maschile, nato nel 1944; diagnosi di Policitemia Vera nel 1980.

Febbraio 2008: mielofibrosi in progressione, nel dicembre 2008: AML M2 FAB

Febbraio 2009: Allotrapianto

Giugno 2009: Riscontro di mutazione JAK2 V617F

Novembre 2010: exitus. Sopravvivenza: 30 anni

Citogenetica Standard

Eseguita un'unica analisi cromosomica su sangue midollare nel Febbraio 2008.

Cariotipo: 46,XY,+9,der(9;18)(p10;q10) in 25/25 cellule esaminate.

FISH

Sonde utilizzate: whole-chromosome painting probes (wcp) and centromeric (CEP) probes dei cromosomi 9 e 18 (Abbott Molecular/Vysis).

Cariotipo secondo i risultati della FISH: 46,XY,+9,der(9;18)(p10;q10).ish der(9;18)(wcp9+,wcp18+, alpha sat 9+,D18Z1+)

La policitemia vera (PV) è un disordine mieloproliferativo clonale caratterizzato da eccessiva produzione di eritrociti, che può evolvere in mielofibrosi e leucemia acuta mieloide. La trasformazione in mielofibrosi avviene nel 15-20% dei casi, e la trasformazione leucemica nel 5-10 % dei pazienti. La sopravvivenza media è di 8-11 anni e la mediana delle età alla diagnosi è di 60 anni. La maggior parte dei pazienti ha cariotipo normale alla diagnosi, mentre durante la trasformazione compaiono spesso anomalie cromosomiche acquisite, quali trisomia 9 e duplicazioni del 9p. La mutazione JAK2 V617F, presente nella maggior parte dei pazienti, sembra avere un ruolo primario nella patogenesi delle malattie

mieloproliferative. Il gene mappa in 9p24, perciò pazienti con duplicazione del 9p hanno una copia aggiuntiva del gene, con conseguente guadagno di funzione [35, 36, 37, 38, 39, 40].

Il riarrangiamento riscontrato nel nostro paziente, indicato come der(9;18)(p10;q10) è un'anomalia rara, riportata in pazienti con Policitemia Vera, Mielofibrosi, Trombocitemia Essenziale e leucemie acute terapia-correlate. Alcuni autori suggeriscono che la simultanea presenza della mutazione JAK2 V617F e del riarrangiamento presente nel nostro paziente identifichi un sottogruppo di pazienti con PV che vanno incontro alla forma mieloproliferativa della malattia, suscettibile di trasformazione in leucemia acuta. Il caso da noi studiato avvalora questa osservazione e costituisce quindi un contributo alla casistica. Come tale è stato accettato per la pubblicazione su "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology".

Caso N° 3: Mieloma Multiplo IgG- λ e traslocazione t(5;22): un'associazione casuale?

Paziente di sesso femminile; nel 2009 all'età di 67 anni diagnosi di mieloma multiplo, sottotipo IgG- λ

Citogenetica Standard

Analisi su aspirato midollare da colture a 24 e 48 ore in bande QFQ, analisi su linfociti stimolati da sangue periferico.

FISH

Per le analisi di FISH sono state utilizzate le seguenti sonde: LSI Rb1(13q14) probe, LSI IgH/CCND1 t(11;14), P53 deletion probe, Mix tel 5p/5q; tel 22q, ABL/BCR, Di George region probe, sonda PAC RP5-1019H10 (locus IGL).

Risultati: 46,XX,t(5;22)(q35;q11)

FISH: Rb del neg, t(11;14) neg, p53 del neg.

- der(5): tel(5p/5q) pos, BCR pos, RP5-1019H10 pos, tel(22q) pos;
- der(22): Di George pos, RP5-1019H10 neg, BCR neg, tel(5q) pos.

Breakpoints: sul cromosoma 5 all'interno della sonda telomerica 5q (Vysis); sul cromosoma 22: fra la regione Di George e la sonda RP5-1019H10

Commenti

Il mieloma multiplo è una neoplasia maligna con proliferazione monoclonale di plasmacellule, spesso preceduta da condizioni premaligne come MGUS (gammopatia monoclonale di significato sconosciuto) o SMM (smoldering

myeloma), con possibile evoluzione verso una leucemia plasmacellulare. Le informazioni citogenetiche nella fase iniziale sono limitate a causa dello scarso indice proliferativo delle cellule maligne; sono frequenti anomalie di numero, che portano a definire due gruppi distinti: le iperdiploidie, con prognosi nettamente più favorevole e coinvolgimento preferenziale di specifici cromosomi e rare anomalie strutturali, e il gruppo ipodiploide, con prognosi nettamente più infausta, e frequente riscontro di anomalie strutturali. Fra queste si segnalano delezioni (13q) e vari riarrangiamenti che coinvolgono il gene IgH (14q32). La paziente qui riportata, affetta da MM, sottotipo IgG lambda, presentava su sangue midollare una traslocazione reciproca, apparentemente bilanciata, fra un cromosoma 5 e un cromosoma 22, indicata come $t(5;22)(q35;q11)$. La traslocazione era confermata da analisi di FISH con la miscela di sonde subtelomeriche 5p/5q. Successivi esperimenti di FISH con le sonde ABL/BCR e Di George collocavano il breakpoint sul cromosoma 5 all'interno della sonda telomerica 5q (Vysis), parzialmente traslocata sul *derivative(22)*, e il breakpoint sul cromosoma 22 nell'intervallo fra la regione Di George e la regione BCR.

Abbiamo voluto indagare principalmente il breakpoint sul cromosoma 22, che cade in una regione di particolare interesse. E' noto infatti che la regione 22q11.2 è una regione ad alto tasso di ricombinazione per la presenza di low-copy repeats [41, 42], ed è altresì noto che le regioni dei cromosomi partner più frequentemente coinvolte in tali riarrangiamenti sono le bande terminali [43]. Ciò concorda con il riscontro nella nostra paziente di riarrangiamento con la regione subtelomerica 5q. La regione 22q11.2 presenta nel nostro caso un ulteriore motivo di interesse. Essa ospita infatti il locus IGL (immunoglobulin lambda) localizzato sul cromosoma 22 a circa 6 Mb dal centromero. Questo locus comprende oltre 90 geni, di cui 37-42 sono geni funzionali, implicati nella sintesi

delle catene lambda delle immunoglobuline [44]. Sono segnalate diverse traslocazioni coinvolgenti il locus IGL con diversi partners, sia in leucemie che linfomi. Poichè nel caso qui presentato la patologia diagnosticata era di sottotipo IgG lambda di MM abbiamo voluto verificare l'eventuale coinvolgimento del locus IGL nel riarrangiamento. A tale scopo abbiamo utilizzato in esperimenti di FISH la sonda RP5-1019H10 che comprende il locus IGL.

L'analisi di FISH ha permesso di escludere un coinvolgimento di tale locus, che risulta integralmente traslocato sul *derivative(5)*. Un successivo controllo su linfociti stimolati ha dimostrato la natura costituzionale della traslocazione, tuttavia non possiamo escludere che essa abbia avuto un ruolo nella patogenesi della malattia.

Caso N° 4: Cariotipo complesso da rivalutazione di sindrome da 5q-

Paziente di 56 anni, di sesso femminile, con grave cardiopatia, ricoverata presso il Reparto di Ematologia per anemia di ndd e sospetta displasia mono-lineare. Dopo il primo ricovero presso il Reparto di Ematologia dell'Università la paziente era seguita presso il reparto di Ematologia dell'Ospedale S. Francesco di Nuoro, che ci ha fornito notizie sull'ulteriore storia clinica.

Citogenetica Standard

L'analisi cromosomica di routine in bande QFQ da colture a 24 e 48 h dimostrava la presenza di una linea cellulare normale e di altre 2 linee cellulari, entrambe con delezione 5q di diversa estensione, del(5)(q15q33) e del(5)(q13q33) rispettivamente.

FISH

Sonde utilizzate: mix tel (5p/5q); mix tel (11p/11q); mix tel (12p/12q); mix tel (10p/10q); wcp (5); wcp (11); wcp (10); BAC RP11-368O19 (5q32).

Risultati

A causa dell'esiguità del materiale disponibile non è stato possibile caratterizzare completamente tutti i cloni patologici, che secondo la nostra interpretazione possono essere riportati come segue:

46,XX,del(5)(q15q33)

46,XX,del(5)(q13q33),der(11)ins(11;5)(p15;q15q31?)

46,XX,der(5)t(5;10)(5pter→5q13::10q24→10qter),der(10)(5;10)(10pter→10q24::5q31qter),der(8)(8pter→8q22::5q31qter)

Variamente distribuita nei vari cloni: delezione interstiziale del(12)(p11p13)

Commenti

La delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 5 fu riportata per la prima volta come un tipo di anemia refrattaria con caratteristici aspetti clinici: predominanza del sesso femminile, macrocitosi, ipoplasia eritroide, trombocitosi e dismegacariopoiesi. La paziente qui riportata era stata avviata all'indagine citogenetica per Anemia di ndd e sospetta displasia mono-lineare; l'analisi cromosomica di routine rivelava la presenza, accanto a una linea cellulare normale, di altre 2 linee cellulari, entrambe con delezione 5q di diversa estensione, del(5)(q13q33) e del(5)(q15q33) rispettivamente. La peculiarità del reperto portava a sospettare riarrangiamenti più complessi coinvolgenti il cromosoma 5, e in effetti analisi di FISH con sonde per painting e sonde subtelomeriche del cromosoma 5, e in seguito di altri cromosomi, permettevano di identificare, in diversi cloni, una traslocazione con inserzione ins(11;5), una traslocazione reciproca t(5;10) e una traslocazione fra il cromosoma 5 e un cromosoma non identificato del gruppo C, oltre alla delezione 5q, con perdita del gene PDGFRB (5q32). Veniva inoltre identificata una delezione interstiziale 12p, variamente distribuita nei diversi cloni.

Conclusioni

Sebbene la delezione 5q sia descritta spesso in associazione con altre anomalie, e perciò il caso qui riportato non presenti carattere di novità ci sembra importante segnalarlo perché dimostra ulteriormente quanto l'analisi convenzionale, anche su preparati di buona qualità, possa essere ingannevole e si rendano perciò necessarie, anche nei casi apparentemente ovvii, analisi di FISH mirate o meglio ancora una multicolor FISH. Il caso qui riportato rappresenta un buon esempio

della varietà e complessità dei cariotipi che possono riscontrarsi nelle sindromi mielodisplastiche, che rappresentano oggi la sfida più stimolante per il citogenetista.

Caso N° 5: Studio di un caso di Philadelphia mascherato

Paziente, maschio, nato 13/08/1927. Nel 2001 riscontro di leucocitosi (leucociti: 35.000 mmc), piastrinopenia (piastrine 65.000 mmc) e presenza di metamielociti all'esame dello striscio da SP, in paziente con K. papillare vescicale trattato localmente con irrigazioni di antraciclinici e resezione transuretrale della lesione. Diagnosi di LMC in fase cronica a basso rischio Sokal, Philadelphia negativa e BCR/ABL p210 positiva (b3a2) su sangue midollare.

Terapia

Luglio 2001 - alfa interferon, alla quale segue normalizzazione dell'emocromo dopo 2 mesi; la terapia viene sospesa nel Dicembre 2001 per comparsa di prurito incontrollabile e noduli sottocutanei. Nel giro di 1 mese si assiste a risalita dei leucociti a 21.000 mmc.

Febbraio 2002 – Imatinib, alla dose di 400 mg/die con normalizzazione dell'emocromo dopo 1 mese di terapia. In ripetuti controlli: midollo BCR-ABL positivo (qualitativo).

Da Dicembre 2002: Imatinib a 600 mg/die.

Ottobre 2003 - Marzo 2005: remissione completa, BCR-ABL negativo.

Settembre 2005. Settembre 2007: remissione parziale, BCR-ABL/ABL da 0,017 a 0,046. FISH interfaseica: nuclei Ph+ al 4% (valore medio).

Giugno 2008: recidiva, BCR-ABL pos

Citogenetica standard in QFQ: 46,XY cariotipo maschile normale

FISH interfaseica: nuclei Ph+ 38% (105/278); metafasi Ph+ 63% (19/30).

Origine del riarrangiamento BCR-ABL

FISH con sonda LSI BCR/ABL Dual Colour Dual Fusion translocation probe (Vysis): presenza del segnale di fusione su un cromosoma 22 apparentemente normale, ABL positivo su entrambi i cromosomi n.9, di dimensioni ridotte in uno dei due .

FISH con sonde subtelomeriche relative ai cromosomi 9 e 22: positive sui cromosomi testati; sonda relativa alla regione bcr (presente come sonda di controllo nella miscela tel 22 Vysis): su uno dei cromosomi 22 (il cromosoma riarrangiato) il segnale appare chiaramente bipartito.

Interpretazione dei risultati: traslocazione della regione ABL con inserzione in BCR.

Cariotipo risultante: 46,XY,ins(22;9)(q11;q34q34).

Discussione

Il marker citogenetico della Leucemia Mieloide Cronica è il cromosoma Philadelphia, derivato da traslocazione 9/22, che porta alla formazione del gene ibrido BCR-ABL. Nel 5-10 % dei casi è presente una traslocazioni variante, con coinvolgimento di un terzo cromosoma, e in casi rari è presente un riarrangiamento criptico (Philadelphia mascherato).

L'avvento delle tecniche di FISH e la disponibilità di sonde commerciali, oltre a fornire uno strumento indispensabile per il monitoraggio citogenetico, hanno permesso di chiarire i meccanismi di origine del riarrangiamento BCR/ABL in pazienti Ph negativi ma risultati positivi all'analisi molecolare. Studi recenti

indicano che parte di questi riarrangiamenti criptici avvengono con delezione di ABL o di BCR [45], e i primi dati clinici sembrano indicare in questi pazienti una risposta all'Imatinib sostanzialmente sovrapponibile a quella dei pazienti con Ph classico. Questo dato si conferma anche nel nostro paziente, per diversi anni in completa remissione clinica. Come già segnalato in letteratura [46], anche nel nostro caso è stata accertata una buona correlazione fra i dati della QT-PCR e della FISH e un significativo valore prognostico delle due analisi congiunte.

Ringraziamenti

Si ringrazia Elsevier per aver concesso l'utilizzo della tabella sulla Classificazione WHO dei tumori emopoietici e linfoidi "WHO classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms" da: Vardiman JW. *Chemico-Biological interaction* (2010) 184: 16-20 [2] - Licenza n°2784791006439 – 09/11/2011

Bibliografia

1. Sudoyo AW, Hardi F. Cytogenetica in solid tumors: lessons from the Philadelphia chromosome. *Acta Med Indones* (2011) 43(1): 68-73.
2. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumor of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasm. *Chemico-Biological interaction* (2010) 184: 16-20.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* (2009) 114: 937-951.
4. Foran JM New Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *Perspective from the Clinic* (2010):47-55.
5. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker E, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK, on behalf of National Cancer Research Institute Adult Leukemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in myeloid acute leukemia: determination of prognostic significance of rare chromosomal abnormalities among 5876 younger patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* (2011) 116:354-365.

6. Grimwade D, Hills RK. Independent factors for AML outcome. *Haematology Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (2009) 385-395
7. Panani AD, Roussos C. Cytogenetic aspects of adult myelodysplastic syndromes: clinical implications. *Cancer Letters* (2006) 235: 177-190.
8. Haase D. *Ann Haematol* (2008)87: 515-526.
9. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtkamp K, Travaglino E, Invernizzi R, Pascutto C, Lazzarino M, Germing U, Cazzola M. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* (2011) 96(10):1433-40.
10. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization (WHO) classification system for myeloproliferative neoplasms. *Cancer* (2009) 115:3842-3487.
11. Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer Letters* (2007) 225:12-25.
12. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6 (1951):372-375.
13. Marzocchi G, Castagetti F, Luatti S, Baldazzi C, Stacchini M, Gugliotta G, Amabile M, Specchia G, Sassarego M, Giussani U, Valori L, Discepoli G, Montaldi A, Santoro A, Bonaldi L, Giudici G, Cianciulli AM, Giacobbi F, Palandri F, Pane F, Saglio G, Martinelli G, Baccarani M, Rosti G, Testoni N; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* (2011) 117(25):6793-800.

14. Delhommeau F, Jeziorowska D, Marzac C, Casadevall N. *Int J Hematol* (2010) 91: 165-173.
15. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Schnittger S, Schoch C. Conventional cytogenetics of myeloproliferative diseases other than CML contribute valid information. *Ann Hematol.* (2005) 84(4):250-7.
16. James C.. The JAK2V617F mutation in Polycytemia Vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:69-75.
17. Tefferi A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:240-5.
18. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, Patnaik M, Schwager S, Ketterling R, Wolanskyj AP. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol.* (2009) 83(1):17-21.
19. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur J Haematol* (2009) 82: 329-338.
20. Campo E, Swerdlow SH, Harris N L, Pileri S, Stein H Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* (2011) 117:5019-5032.
21. Chng WJ, Fonseca R. Centrosome and Myeloma: aneuploidy and proliferation. *Environ Mol Mutagen* (2009) 50(8):697-707.
22. Molecular diagnostic in Hematological Oncology/ Stephan Stilgenbauer; Hartmut Döhner. 1st edition UNI-MED 2008: Cap 2, 28-36; Cap 4, 50-57; Cap 5, 60-72; Cap 3, 38-48.

23. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009: 522-31.
24. Bernheim A. Cytogenomics of cancers: from chromosome to sequence. *Mol Oncol*. (2010) 4(4):309-22.
25. Sambbrock J, Russel DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third edition 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Voll. 1, 3
26. Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds) "Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer" (2011). <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
27. Rodrigues Pereira Velloso ED, Kassab C, Figueira SHA, Noguchi DT, Armelin Benites EC, Manguera CLP, de Oliveira FM . *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. September 2009 URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/dic0709RodriguesID100043.html>
28. Pan J, Xue J, Wuy, Wang Y, Sheen J. Dicentric (7;9)(p11;p11) is a rare but recurrent abnormality in acute lymphoblastic leukemia: a study of 7 cases. *Cancer Genet Cytogenet* (2006) 169(2):159-63.
29. Lundin C., Heidenblad M, Strömbek B, Borg Å, Hovland R, Heim S, Johansson B. Tiling resolution array CGH of dic(8;9)(p11-13; p11-13) in B-cell precursor acute Lymphoblastic leukemia reveals clustered breakpoints at 7p11.2-12.1 and 9p13.1. *Cytogenet Genome Res* (2007) 118:13-18.
30. Mullighan CG, Miller CB, Radke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR. BCR-ABL1 Lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* (2008) 453:110-4.

31. Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S, Astolfi A, Chiaretti S, Vitale A, Messa F, Impera L, Baldazzi C, D'Addabbo P, Papayannidis C, Lonoce A, Colarossi S, Vignetti M, Piccaluga PP, Paolini S, Russo D, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Foà R, Martinelli G. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR_ABL1 positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood* (2009) 114(10):2159-67.
32. Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* (2000) 95(3):738-43.
33. Kolomietz E, Al-Magharabi j, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* (2001) 97(11):3581-8.
34. Huntly BJP, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Sheperd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* (2001) 98:1732-8.
35. Chen Z, Notohamiprodjo M, Guan XY, Paietta E, Blackwell S, Stout K, Turner A, Richkind K, Trent JM, Lamb A, Sandberg AA. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythemia vera *Genes chromosomes Cancer*. (1998) 22(4):321-4.

36. Andrieux J, Demory JL, Caulier MT, Agape P, Wetterwald M, Bauters F, La^Ø JL Karyotypic abnormalities in myelofibrosis following polycythemia vera. *Cancer g Gnet Cytogenet* (2003) 140(2):118-123.
37. Bacher U, Haferlach T, Schoch C. Gain of 9p due to an unbalanced rearrangement der(9;18): a recurrent clonal abnormality in chronic myeloproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* (2005) 160(2):179-83.
38. Stauffer Larsen T, Hasselbach HC, Pallisgaard N, Kerndrup GB. A der(18)t(9;18)(p13;p11) and a der (9;18)(p10;q10) in polycythemia Vera associated with a hyperproliferative phenotype in transformation to postpolycythemic myelofibrosis. *Cancer Genet Cytogenet.* (2007) 172 (2):107-12.
39. Ohyashiki K, Kodama A, Ohyashiki JH. Recurrent der(9;18) in essential thrombocytemia with JAK2 V617F is highly linked to myelofibrosis development. *Cancer Genet Cytogenet.* (2008) 186 (1) 6-11.
40. Unbalanced rearrangement der(9;18)(p10;q10) in a patient with polycythemia vera. XU X, ChenX, Rauch EA, Johnson EB, Thompson KJ, Laffin JJS, Raca G, Kurtycz DF. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* April 2010 URL:
<http://AtlasGeneticsOncology.org/Reports/der0918XuID100044.html>
41. Halford S, Lindsay E, Natudu M, Carey AH, Baldini A, Scambler PJ. Low copy number repeat sequences flank the Di-George/velo-cardio-facial syndrome loci at 22q11. *Hum Mol. Genet.* (1993) 2: 91-196.
42. Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palaisvamy N, Ghaganti RKS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol genet.* (1999) 8:1157-1167.

43. Spiteri E, Babcock M, Kashork CD, Wakui K, Gogineni S, Lewis DA, Williams KM, Minishima S, Sasaki T, Shimizu N, Potocki L, Pulijaal V, Shanske A, Shaffer LG, Morrow BE. Frequent translocations occur between low copy repeats on chromosome 22q11.2 (LCR22s) and telomeric bands of partner chromosomes. *Hum Mol genet.* (2003) 12:1823-1837.
44. Frippiat JP, Williams SC, Tomlison IM, Cook GP, Cherif D, Le Paslier D, Collins JE, Dunham I, Winter G, Lefranc MP. Organization of immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol genet.* (1995) 4 (6):983-991.
45. Richebourg S, Eclache V, Perot C, Portnoi MF, Van den Akker J, Terré C, Maareck O, Soenen V, Viguié F, Lai JL, Andrieux J, Corm S, Roche - Lestienne C, Fi-LMC group. Mechanism of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to Imatinib therapy. *Cancer Genet. Cytogenet.* (2008) 182(2):95-102.
46. Press RD, Love Z, Tronnes AA, Yang R, Tran T, Mongoue-Tchokote S, Mori M, Mauro MJ, Deininger MW, Druker BJ. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* (2006) 107(11):4250-6.