



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia**

**Sezione di Ematologia**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE EMATOLOGICHE**

XXVI ciclo

Coordinatore Prof. Robin Foà

**TESI DI DOTTORATO**

**Identificazione di nuovi marcatori molecolari nelle  
LAL mediante l'integrazione del profilo di  
espressione genica e dello stato mutazionale dei  
nuovi geni**

Relatore

Dott.ssa Sabina Chiaretti

Dottoranda

Dott.ssa Fulvia Brugnoletti

Anno Accademico 2012-2013

# Indice

## Capitolo 1 - La Leucemia Linfoblastica Acuta

1.1	Generalità	3
1.2	Quadro clinico e cardini diagnostici	6
1.2.1	Valutazione citomorfologica	7
1.2.2	Valutazione immunofenotipica	9
1.2.3	Indagini citogenetiche e biologia molecolare	11
1.3	Genetica della LAL: nuovi marcatori molecolari	16
1.4	Fattori prognostici e cenni di terapia	20

## Capitolo 2 - Next Generation Sequencing

2.1	Introduzione	23
2.2	Principi della tecnica	24
2.3	Sistema GS Junior 454	27
2.4	NGS in ematologia	33

## Capitolo 3 - Progetto 1: Valutazione dell'espressione del gene *CRLF2* in pazienti adulti affetti da leucemia acuta linfoide B

3.1	Introduzione	35
3.2	Materiali e metodi	37
3.2.1	Caratteristiche dei pazienti	37
3.2.2	Estrazione dell'RNA e reazioni di PCR	39

3.3	Risultati	40
3.3.1	Espressione del gene <i>CRLF2</i>	40
3.3.2	Identificazione del trascritto <i>P2RY8/CRLF2</i>	46
3.4	Discussione	47

## **Capitolo 4 - Progetto 2: Valutazione delle mutazioni del gene TP53 nella LAL B nell'ambito del progetto IRON II**

4.1	Background	50
4.1.1	Il gene <i>TP53</i>	50
4.2.1	Studio Amplichip p53	53
4.2	Il progetto IRON	57
4.2.1	Materiali e metodi	59
	Casistica analizzata	59
	Amplicon Sequencing	62
	Controllo di qualità ed analisi dei dati	63
4.2.2	Risultati	64
4.2.3	Discussione	68

<b>Bibliografia</b>	<b>72</b>
---------------------	-----------

# Capitolo 1

## La Leucemia Linfoblastica Acuta

### 1.1 Generalità

La leucemia acuta linfoide (LAL) è una neoplasia ematologica biologicamente e clinicamente molto eterogenea, causata dall'espansione di cellule immature della linea linfoide (linfoblasti) che infiltrano il midollo osseo ed il sangue periferico, con conseguente compromissione della normale attività emopoietica. La patologia può riguardare tanto la filiera linfoide B che linfoide T.

Questa malattia rappresenta la più comune forma di leucemia del bambino ed è caratterizzata da un andamento bimodale, con un picco di incidenza tra i 2 ed i 10 anni ed un secondo picco dopo i 65 anni. Inoltre, sembra esistere una relazione tra l'insorgenza della patologia ed alcuni fattori socio-economici, quali urbanizzazione e migliori condizioni igienico-sanitarie. Lo sviluppo della LAL sembra infatti essere più frequente nella popolazione Caucasica dei paesi industrializzati residente in aree urbane, e nel sesso maschile (rapporto uomo-donna circa 2:1) (Pui CH *et al*, Lancet 2008; Inaba H. *et al*, Lancet 2013).

L'evento patogenetico che porta allo sviluppo della leucemia è tuttora sconosciuto, tuttavia come per la maggior parte dei tumori solidi, l'eziologia sembra essere multifattoriale e legata all'interazione tra l'esposizione ambientale e la presenza di una suscettibilità genetica. Tra i fattori ambientali riconosciuti ricordiamo l'esposizione ad alte dosi di radiazioni ionizzanti (esplosione di bomba atomica, incidenti legati a reattori nucleari) ed a sostanze tossiche (benzene, pesticidi, solventi chimici). L'esposizione a campi elettromagnetici ed il fumo di sigaretta rappresentano ancora dei fattori di rischio controversi.

L'osservazione della presenza di un picco di incidenza della patologia tra i 2 ed i 5 anni e la sua relazione con le migliori condizioni igieniche e socio-economiche, ha portato allo sviluppo di due ipotesi che vedono la malattia come il risultato di una risposta immunitaria anomala ad una infezione comune (Greaves M. *et al*, Nat Rev Cancer 2006; Greaves MF. *et*

*al*, Lancet 1997; Buffler PA *et al*, Cancer Invest. 2005). Infatti, sebbene non sia stato evidenziato nell'uomo alcun agente patogeno in grado di indurre la leucemia, come accade in alcune specie animali, questa sarebbe causata in maniera indiretta dall'esposizione di individui suscettibili ad agenti patogeni non endemici, come risultato di un aumentato mix di popolazione (ipotesi di Kinlen) (Kinlen L. Oncogene 2004). Secondo l'ipotesi di Greaves, invece, la malattia sarebbe correlata alla presenza di cloni preleucemici in individui che nell'infanzia non sono stati esposti ai patogeni comuni. In questi pazienti l'esposizione tardiva alle infezioni, potrebbe causare una risposta immunitaria incontrollata e patologica (Greaves M. Nat Rev Cancer, 2006).

Per quanto riguarda la suscettibilità genetica, solo il 5% dei casi di leucemia acuta linfoide sembra essere associato a sindromi genetiche predisponenti. Tra queste vanno ricordate tutte quelle patologie caratterizzate da una eccessiva fragilità cromosomica, come la sindrome di Down, la sindrome di Bloom, l'atassia-teleangectasia e l'anemia di Fanconi (Toledano SR. *et al*, Cancer 1980; Zwaan CM. *et al*, Hematol Oncol Clin North Am 2010).

A supporto della presenza di una predisposizione genetica, l'origine prenatale della malattia è stata dimostrata attraverso studi effettuati su casi di leucemia nei gemelli monozigoti, insieme all'identificazione di geni di fusione e riarrangiamenti clonali dei geni delle immunoglobuline e del T-cell-receptor su campioni di sangue cordonale (Maia AT *et al*, Genes Chromosomes Cancer 2004; Hong D. *et al*, Science 2008).

Studi genomici di popolazione, eseguiti su ampie casistiche di pazienti pediatrici affetti da LAL, hanno recentemente portato all'identificazione di varianti alleliche associate con l'insorgenza della leucemia. In particolare, è stata dimostrata la correlazione tra la presenza di single nucleotide polymorphisms (SNPs) nei geni in *IKZF1*, *ARID5B*, *CEBPE* e *CDKN2A* ed una suscettibilità ereditaria allo sviluppo della malattia (Yang W. *et al*, Leukemia 2010; Yang JJ. *et al*, JAMA 2009; Sherborne AL. *et al*, Nat Genet 2010). Questi geni svolgono un ruolo chiave nei processi di sviluppo, proliferazione e differenziazione cellulare e le variazioni nucleotidiche a loro carico sembrano in grado di conferire una predisposizione ereditaria allo sviluppo del clone leucemico, contribuendo sia a processi di trasformazione dei precursori staminali in utero, che alla promozione di un fenomeno di evoluzione clonale postnatale.

Infine, è stata inoltre riportata una variante germinale del gene *PAX5* ricorrente nei membri di due distinte famiglie affette da una forma di leucemia familiare, suggerendone un ruolo predisponente (Shah S. *et al*, Nat. Genet 2013).

## 1.2 Quadro clinico e cardini diagnostici

La sintomatologia legata all'insorgenza della malattia è piuttosto aspecifica. I sintomi più comuni sono rappresentati da astenia, febbre, dolori ossei, sudorazione notturna e calo ponderale. Essi sono la diretta conseguenza dell'infiltrazione midollare da parte delle cellule leucemiche e della conseguente riduzione marcata dell'attività emopoietica. I segni clinici principali sono infatti rappresentati da pallore e tachicardia conseguenti all'anemia, infezioni prolungate o ricorrenti dovute alla neutropenia e comparsa di manifestazioni emorragiche di diverso tipo (petecchie, epistassi, gengivorragia) per la piastrinopenia. Linfadenomegalie ed epatosplenomegalia sono frequenti (circa 60% dei casi) e sono causate dall'infiltrazione dei linfonodi, del fegato e della milza da parte dei linfoblasti. Nel 15% circa dei casi è presente un impegno mediastinico, spesso associato ad effusioni pleuriche. Sedi meno frequenti di localizzazione della malattia sono rappresentate da tessuti orbitali, cute, ossa ed articolazioni. Un quadro particolare è rappresentato dalla localizzazione testicolare monolaterale, più frequente in età pediatrica e nei casi di recidiva di malattia.

Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale è presente alla diagnosi in circa il 5-10% dei casi ed è frequentemente associato a sintomi quali nausea, vomito e cefalea persistente.

Circa la metà dei pazienti presenta alterazioni all'esame emocromocitometrico quali anemia e trombocitopenia come conseguenza della ridotta attività emopoietica midollare, associate a leucopenia o leucocitosi. Gli altri esami di laboratorio presentano solitamente alterazioni aspecifiche, come incremento della lattato deidrogenasi (LDH) e dell'uricemia, legate a fenomeni di lisi tumorale ed alterazioni degli indici epatici e renali.

La diagnosi della malattia si basa su un approccio integrato, che vede come punto di partenza l'identificazione delle cellule neoplastiche nello striscio di sangue periferico o midollare.

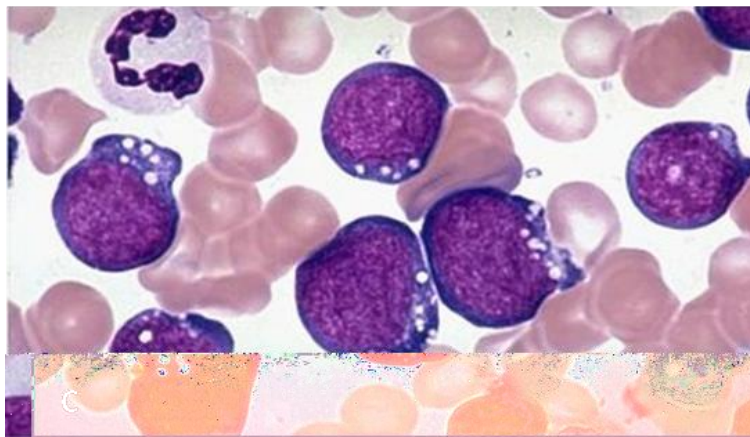
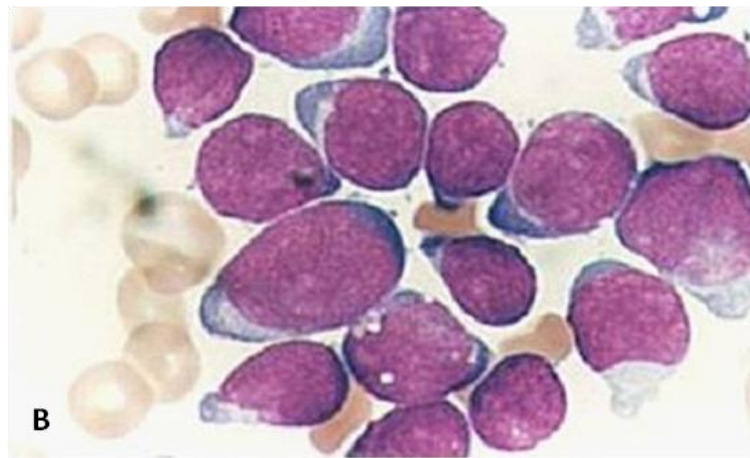
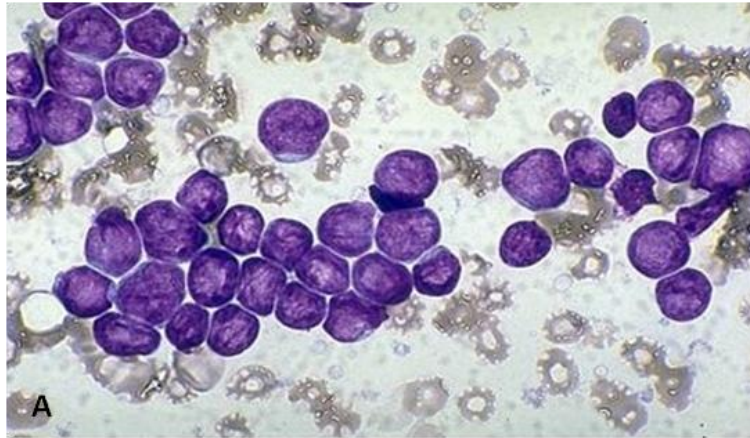
### 1.2.1 Valutazione citomorfologica

Lo step iniziale per l'inquadramento diagnostico della LAL è rappresentato dall'osservazione al microscopio ottico di strisci di sangue venoso periferico e di sangue midollare colorati con May-Grunwald Giemsa. Per porre diagnosi di LAL deve essere presente nel midollo una quota di blasti  $\geq 30\%$  secondo la classificazione proposta dal *French-American-British cooperative group* (FAB)(Bennett JM. *et al*, Br J Haematol. 1976) o  $\geq 20\%$  secondo lo schema proposto dalla *World Health Organization* (WHO) (Harris NL., *et al*, J Clin Oncol 1999; Vardiman JW. *et al*, Blood 2009; . La classificazione FAB identifica tre principali sottotipi di LAL, sulla base delle dimensioni delle cellule leucemiche e sull'esito di reazioni citochimiche:

1. LAL L1: blasti di piccole dimensioni con citoplasma scarso, nucleo tondo, cromatina nucleare condensata e nucleoli assenti o poco visibili (Figura 1A). Questa forma di leucemia è frequente nel bambino e più rara nell'adulto , dove si presenta nel 10-20% dei casi.
2. LAL L2: blasti di medie dimensioni, con citoplasma più abbondante ed eterogeneo, dal carattere tendenzialmente basofilo. Il nucleo si presenta irregolare con cromatina dispersa e nucleoli più evidenti (Figura 1B). È la forma più frequente nell'adulto (70-80%).
3. LAL L3: blasti di grandi dimensioni, caratterizzati da citoplasma intensamente basofilo con nucleoli e vacuoli citoplasmatici ben evidenti (Figura 1C). Questo sottotipo morfologico è raro nell'adulto (1-5%) e rappresenta un'entità separata rispetto alle precedenti sia da un punto di vista clinico-biologico che terapeutico.

Per quanto riguarda i saggi citochimici, le cellule leucemiche linfoidei appaiono negative al test per la mieloperossidasi (MPO) e ciò consente di distinguerle dalle cellule di linea mieloide positive per questa proteina lisosomiale. I linfoblasti sono inoltre positivi in circa il 95% dei casi all'enzima nucleare deossiribonucleotidil-transferasi terminale (TdT), che appare invece negativa nella leucemia acuta mieloide.





**Figura 1-** Classificazione FAB dei tre sottotipi di LAL: colorazione May-Grünwald-Giemsa. **A.** FAB L1: cellule di piccole dimensioni, scarso citoplasma, cromatina addensata, nucleoli assenti. **B.** FAB L2: blasti di medie dimensioni caratterizzati da citoplasma abbondante tendenzialmente basofilo; nucleo irregolare, cromatina dispersa con evidenti nucleoli. **C.** FAB L3: cellule di grandi dimensioni con citoplasma fortemente basofilo caratterizzato da vacuoli e nucleoli ben evidenti.

### 1.2.2 Valutazione immunofenotipica

La caratterizzazione degli antigeni espressi sulla cellula leucemica rappresenta un punto fondamentale dell'inquadramento diagnostico della LAL (Bené MC. *et al*, Immunol Lett 2005). Essa consente infatti di definire la linea di appartenenza delle cellule neoplastiche, il loro stato di maturazione e di differenziazione e la presenza di eventuali aberrazioni, ossia la presenza sulla superficie cellulare di marcatori non linea specifici. Inoltre, dato che nella maggior parte dei casi di LAL l'immunofenotipo non varia nel tempo, attraverso questa valutazione è possibile seguire la malattia anche quando la quota di cellule leucemiche è presente ad un livello molto basso ( $10^{-4}$ ). La tecnica si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali coniugati a fluoro croma che consentono la valutazione simultanea di differenti antigeni espressi dalla cellula. Esistono pannelli di anticorpi specifici utilizzati per individuare e distinguere le cellule della linea B (ad esempio CD10, CD19, CD79a) da quelle di linea T (CD1a, CD7, CD3) e di linea mieloide (CD13, CD33). Sulla base della positività o meno di questi anticorpi è possibile definire due forme di leucemia acuta linfoide: quella a fenotipo B, che rappresenta la più frequente (70-80% dei casi adulti e 85-90% dei bambini) e quella più rara a fenotipo T (20-25% degli adulti e 10-15% dei casi pediatrici).

Sulla base dell'espressione dei differenti antigeni sia a livello superficiale che citoplasmatico, possono essere identificate quattro forme di LAL B. In particolare gli antigeni espressi più precocemente dalle cellule di linea B sono il CD19, il CD22 e il CD79a. La positività per questi marcatori definisce la LAL a fenotipo pro-B. La presenza sulla superficie cellulare del CD10 o antigene CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen) identifica invece un fenotipo B-common, presente in un'elevata percentuale di casi. Nei casi in cui sia invece possibile identificare al livello intracitoplasmatico le catene leggere o pesanti delle immunoglobuline si parla di LAL a fenotipo pre-B. Si definisce invece matura una LAL che presenti l'espressione sulla superficie cellulare di immunoglobuline in assenza della TdT. Questa forma è invariabilmente associata ad un sottotipo FAB L3.

Anche per quanto riguarda le LAL T, in base all'espressione dei differenti antigeni si possono identificare quattro sottotipi: le LAL a fenotipo pro-T (CD7 e CD3 intracitoplasmatico positivi), quella a fenotipo pre-T caratterizzata dall'espressione del CD2 e/o CD5 e/o CD8, la forma T corticale associata all'espressione del CD1a ed una forma T matura definita dalla

positività per il CD3 di superficie e negativa per il CD1a. Le forme T vengono poi ulteriormente classificate sulla base della presenza di un T-cell receptor di tipo  $\alpha/\beta$  oppure  $\gamma/\delta$ .

Studi recenti (Coustan-Smith E. *et al*, Lancet Oncol 2009; Chiaretti S. *et al*, Haematologica 2010) hanno consentito di evidenziare un nuovo sottogruppo, definito *Early T-cell Precursor* (ETP), che rappresenta circa il 12% delle LAL T, caratterizzato dall'iperespressione di antigeni di staminalità (CD34, KIT) e di geni della linea mieloide (*CEBPA*, *SPI1*), e bassa espressione di geni associati alla linea T (CD1, CD3, CD4, CD8, ZAP-70, LCK), suggerendo una similarità a cellule mieloidi. In questi pazienti, ancor più recentemente, è stata dimostrata, mediante l'utilizzo di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione, la presenza di uno spettro di mutazioni caratteristiche della leucemia acuta mieloide (LAM), a confermare la maggiore somiglianza di queste cellule ai blasti mieloidi rispetto a quelli linfoidei. Tali mutazioni coinvolgono infatti i geni *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *FLT3* ed *NRAS* (Van Vlierberghe *et al*. J Exp Med 2011), già descritti nelle LAM.

Raramente è possibile la coespressione di antigeni linfoidei e mieloidi su di una stessa cellula leucemica (leucemia bifenotipica) oppure su popolazioni differenti (leucemia ibrida). I marcatori mieloidi più comuni identificabili nelle leucemie bifenotipiche sono rappresentati dal CD13 e dal CD33. La loro identificazione nei casi di LAL alla diagnosi è particolarmente utile per il monitoraggio successivo della malattia.

Un altro parametro di valutazione importante nella caratterizzazione di una LAL è l'intensità con cui l'anticorpo monoclonale è espresso sulla cellula, che consente di distinguere i blasti leucemici dalla controparte normale, e di monitorizzare la malattia attraverso la quantificazione della quota blastica durante e dopo il trattamento.

### 1.2.3 Indagini citogenetiche e biologia molecolare

Circa il 75% delle LAL presentano alterazioni cromosomiche ricorrenti, individuabili attraverso indagini citogenetiche o tecniche molecolari. L'identificazione di queste aberrazioni consente un'ulteriore caratterizzazione della malattia, fornendo informazioni utili da un punto di vista prognostico e terapeutico, per la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio ed il monitoraggio della malattia (Faderl S. *et al*, Blood 1998).

La citogenetica classica è basata sull'esame del cariotipo, effettuato mediante bandeggio dei cromosomi in cellule leucemiche bloccate in metafase. Questa tecnica permette quindi di rilevare anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi, sia bilanciate che non bilanciate, ma è utilizzabile solo in una parte dei casi di LAL, data la difficoltà delle cellule linfoidi leucemiche ad andare in mitosi.

Una tecnica più recente è la *Fluorescent in Situ Ibridization* (FISH), che utilizza invece sonde fluorescenti complementari a specifiche sequenze genomiche di interesse. Il legame tra le sonde e la sequenza avviene su cromosomi di cellule in interfase e ciò rende questa tecnica particolarmente utile in quei casi in cui non si riesca ad ottenere un numero sufficiente di metafasi valutabili per l'analisi del cariotipo. Alle analisi citogenetiche si affiancano gli studi di biologia molecolare, realizzati attraverso tecniche di *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), che permettono l'identificazione dei trascritti di fusione più comuni nella LAL. Attraverso un'analisi di PCR qualitativa eseguita all'esordio della malattia, viene identificata la presenza di determinati marcatori molecolari, che vengono poi valutati tramite PCR quantitativa (Q-PCR) per ottenere una quantificazione vera e propria della malattia, sia all'esordio che nel follow-up.

A queste tecniche convenzionali, si sono affiancati nelle ultime due decadi studi di *Gene Expression Profiling* (GEP) grazie ai quali è stato possibile identificare profili genici associati ad aberrazioni citogenetico/molecolari specifiche ed, in minor misura, alla prognosi ed alla risposta alla terapia (Chiaretti S. *et al*, Clin Cancer Res. 2005; Chiaretti S. *et al*, Blood 2004). Un ulteriore sviluppo delle conoscenze biologiche è stato dato dallo studio degli SNP che ha consentito di identificare, soprattutto nell'ambito delle LAL B, lesioni aggiuntive coinvolgenti geni che rivestono un ruolo importante nei processi di sviluppo e differenziazione del

linfocita, di regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi (Yang JJ, Cheng C, Yang W, et al. Genome-wide interrogation of germline genetic JAMA 2009.)

### Alterazioni citogenetiche e molecolari caratteristiche della LAL B

Le principali alterazioni strutturali presenti nelle LAL a fenotipo B sono rappresentate dalle traslocazioni. Negli adulti la più frequente e clinicamente rilevante è rappresentata dalla traslocazione t(9;22)(q34;q11), che dà origine al trascritto di fusione *BCR/ABL1* (cromosoma Philadelphia), con formazione di una proteina chimerica ad attività tirosin chinasi costitutivamente aumentata. Questa alterazione è presente in circa il 30% delle LAL dell'adulto e la sua frequenza aumenta fino a raggiungere più del 50% nei pazienti di età superiore ai 50 anni (Chiaretti S *et al*, Haematologica 2013); è invece piuttosto rara nei casi pediatrici (2-5%). I pazienti affetti da LAL *BCR/ABL1+* nel passato presentavano una prognosi sfavorevole se trattati con regimi chemioterapici standard. Negli ultimi anni l'introduzione degli inibitori delle tirosin chinasi (TKI) in combinazione alla chemioterapia standard, ha notevolmente migliorato la sopravvivenza di questi pazienti.

Per quanto riguarda le traslocazioni coinvolgenti il gene *MLL* (11q23), la più comune è la t(4;11)(q21;q23) presente in circa il 4-9% dei casi adulti e nel 1-2% di quelli pediatrici. Questa alterazione è la più frequente nei pazienti di età <12 mesi, dove è presente nel 50% dei casi. La t(4;11) porta alla formazione del trascritto di fusione *MLL/AF4* e si accompagna tipicamente ad un fenotipo pro-B. Da un punto di vista clinico, la presenza di tale trascritto si associa ad una prognosi infausta, soprattutto nei neonati con età inferiore ai tre mesi, negli anziani e nei pazienti non rispondenti alla terapia con prednisone.

Meno frequenti sono la t(11;19)(q23;p13.3)/*MLL-ENL* e la t(9;11)(p22;q23)/*MLL-AF9*. Una traslocazione che conferisce invece una prognosi favorevole è rappresentata dalla t(12;21)(p13;q22), che porta alla formazione del trascritto di fusione *ETV6/RUNX1*. Questa aberrazione presenta un'elevata incidenza nei bambini (25% circa), mentre è rara nell'adulto e virtualmente assente dalla terza decade di vita.

Meno frequente è la traslocazione t(1;19)(q23;p13.3) presente nell'1-3% dei casi adulti e nel 1-6% dei pediatrici. Essa porta alla formazione del trascritto di fusione *E2A/PBX1*, il cui significato prognostico resta ancora controverso ed è probabilmente dipendente dall'intensità della terapia cui i pazienti vengono sottoposti.

Un altro gruppo prognostico sicuramente favorevole è invece rappresentato dai pazienti le cui cellule leucemiche presentano un numero di cromosomi superiore a 50 (iperdiploidi).

L'iperdiploidia è l'alterazione cromosomica numerica più comune nelle LAL B, dove si può osservare nel 25-30% dei casi pediatrici. È invece più rara negli adulti: si osserva infatti solo nel 6-10% dei casi. L'ipodiploidia, cioè la presenza nelle cellule leucemiche di un numero di cromosomi inferiore a 46 cromosomi, si riscontra con una frequenza inferiore (3-7%) sia nelle casistiche adulte che pediatriche, ed è generalmente associata ad un andamento sfavorevole. All'interno del gruppo degli ipodiploidi bisogna poi distinguere tra i pazienti che presentano cellule leucemiche con 45 cromosomi, aventi una prognosi migliore, ed i casi con meno di 45 cromosomi, caratterizzati da un andamento nettamente sfavorevole.

Anomalia cromosomica	Gene coinvolto	Incidenza	Significato prognostico
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL</i>	2-3% bambini; 25-30% adulti; >50% anziani,	sfavorevole
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	50% età <1 anno, 2-9% adulti e bambini	sfavorevole
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	1-5% bambini e adulti	variabile-intermedia
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i>	20-30% bambini <1% adulti	favorevole nei bambini
iperdiploidia	-	25-30% bambini, 6-10% adulti	favorevole
ipodiploidia	-	3-7% bambini e adulti	sfavorevole

**Tabella 1**-Principali alterazioni cromosomiche nelle LAL B con relativa incidenza e significato prognostico.

Nonostante nella maggior parte dei casi di LAL B sia possibile identificare una di queste alterazioni, una elevata percentuale di pazienti presenta alla diagnosi un cariotipo normale, in assenza di trascritti di fusione ricorrenti. Negli ultimi anni questi casi sono stati oggetto di

numerosi studi, che, avvalendosi di tecnologie di sequenziamento di ultima generazione hanno portato all'individuazione di nuove lesioni aventi un ruolo chiave nel processo di leucemogenesi, come descritto in seguito.

#### Alterazioni citogenetiche e molecolari caratteristiche della LAL T

L'introduzione di nuove tecnologie quali FISH, analisi molecolare e studio del profilo di espressione genica ha consentito di ampliare notevolmente le conoscenze sulla biologia della LAL a fenotipo T, portando all'identificazione di alterazioni specifiche (Ferrando AA. *et al*, Cancer Cell 2002) presenti in questa patologia ed implicate nel processo di trasformazione neoplastica.

Tra le aberrazioni più frequenti troviamo quelle che coinvolgono le regioni 14q11 e 7q34, dove mappano i TCRA/D e B rispettivamente. Queste alterazioni sono presenti nel 35% circa dei pazienti (Cauwelier B. *et al*, Leukemia 2006; Chiaretti S. *et al*, Haematologica 2009) e portano alla giustapposizione dei geni promotori del TCR a fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento cellulare T, con conseguente deregolazione dell'emopoiesi. Il riarrangiamento molecolare più frequentemente riportato nella LAL T è invece rappresentato dal *SIL/TAL1*, che origina principalmente dalla delezione intracromosomica della regione 1p32. Questa alterazione è presente nel 9-30% dei casi pediatrici, e causa l'iperespressione del fattore di trascrizione *TAL1*, necessario per la corretta emopoiesi. Altre anomalie frequenti sono quelle che causano la deregolazione dei geni del gruppo *HOX*, le più comuni delle quali sono le  $t(7;10)(q34;q24)$  e  $t(10;14)(q24;q11)$ , che inducono un'aumentata espressione del gene *HOX11*. Queste traslocazioni si riscontrano nel 30% dei casi adulti, mentre sono più rare nei bambini. Altre alterazioni frequenti sono la  $t(10;11)(q23;p13)$ , che causa la formazione del trascritto di fusione *CALM/AF10*, presente nel 10% dei casi, la delezione criptica del(9)(q34.11q34.13) che dà origine al prodotto *SET/NUP214* (4,6% dei casi adulti) (Dik WA. *et al*, Leukemia 2005; Van Vlierberghe P. *et al*, Blood 2008) e le anomalie coinvolgenti il fattore di trascrizione *TAL1* ed il gene *MLL*.

Anche nelle LAL a fenotipo T è poi possibile riscontrare riarrangiamenti che coinvolgono il gene *ABL1*, il più frequente dei quali è rappresentato dal gene di

fusione *NUP214/ABL1*, presente in circa il 6% delle LAL T (Graux C. *et al*, Leukemia 2009). Più rara la *t(9;14)(q34;q32)* che porta alla formazione del trascritto di fusione *EML1-ABL1*, associato alla delezione del gene *CDKN2A* e all'iperpressione di *HOX11* (De Keersmaecker K. *et al*, Blood 2005).

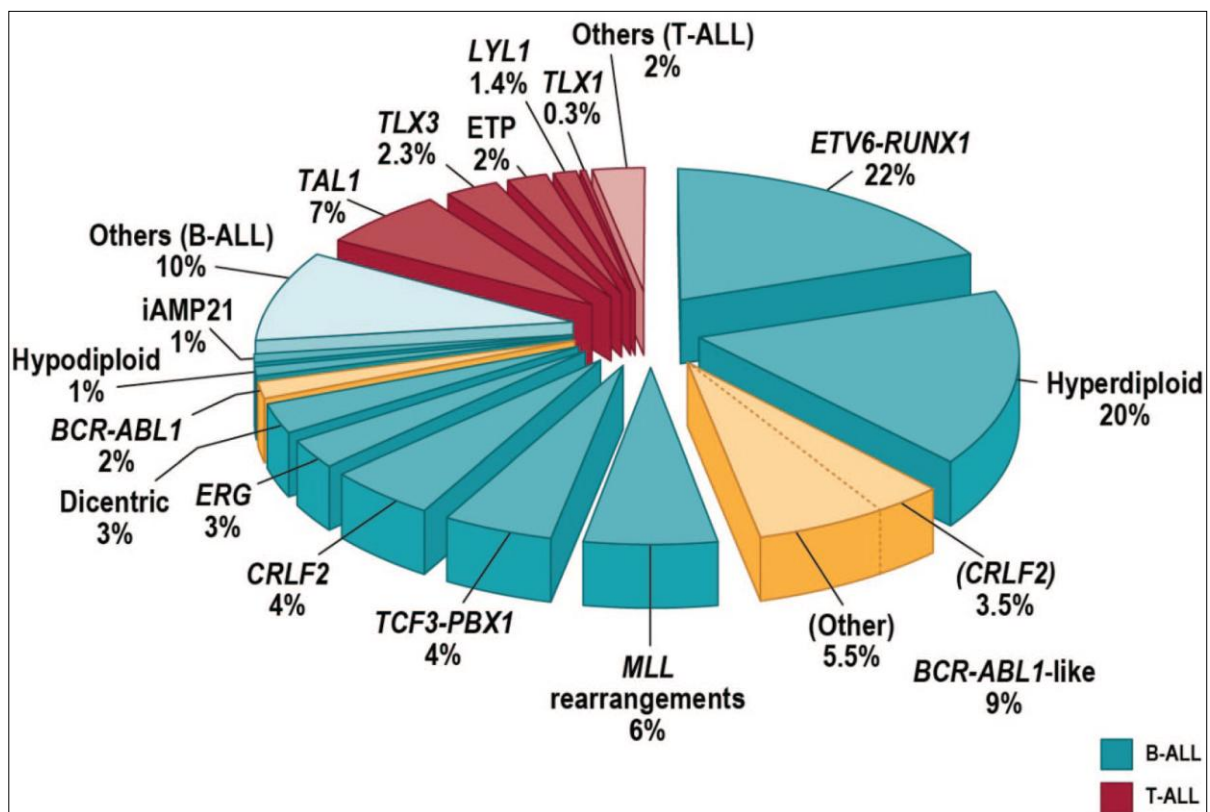
Anomalia cromosomica	Gene coinvolto	Incidenza
del 1p32	<i>SIL-TAL1</i>	5-10% adulti, 10-30% pediatrici
del(9)(q34.11q34.13)	<i>SET-NUP214</i>	4-6% adulti
<i>t(10;11)(q23;p13)</i>	<i>CALM-AF10</i>	10% adulti e bambini
<i>t(9;9)(q34;q34)</i>	<i>NUP214-ABL1</i>	3-6% adulti e bambini
<i>t(7;10)(q34;q24)</i> <i>t(10;14)(q24;q11)</i>	<i>HOX11-TCR</i>	30% adulti, 5% bambini
<i>t(11;19)(p22;q23)</i>	<i>MLL-ENL1</i>	2% adulti e bambini

**Tabella 2-** Principali alterazioni cromosomiche nelle LAL T con relativa incidenza nelle casistiche adulte e pediatriche.



### 1.3 Genetica della LAL: nuovi marcatori molecolari

Nell'ultimo decennio l'entrata in uso di tecniche basate sull'utilizzo di array (*Gene Expression Profiling, Comparative Genome Hybridization-array e Single Nucleotide Polymorphism-array*) ha notevolmente ampliato le conoscenze sulle basi genetiche della LAL (Mullighan CG. *et al*, Leukemia 2009). In epoca ancora più recente l'avvento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione ha consentito di identificare un numero sempre maggiore di alterazioni submicroscopiche del DNA, molte delle quali aventi grande rilevanza per la stratificazione di rischio o anche da utilizzare come possibili target terapeutici (Mullighan CG. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012) (Figura 2). Questo riveste una particolare importanza nel sottogruppo delle LAL prive dei comuni riarrangiamenti molecolari, sulle quali si stanno focalizzando numerosi studi, al fine di identificare nuovi marcatori molecolari da utilizzare a scopo prognostico e terapeutico.



**Figura 2-** Frequenza delle alterazioni genetiche nelle LAL pediatriche (Mullighan CG Hematology Am Soc Hematol Educ Program.2012).

La maggior parte delle alterazioni identificate nella LAL a fenotipo B sono rappresentate da lesioni focali di geni che svolgono un ruolo chiave nel differenziamento linfoide (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*, *LEF1*), nella regolazione del ciclo cellulare o geni oncosoppressori (*CDKN2A/CDKN2B*, *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *ATM*, *PTEN*, *RB1*, *TP53*). Nel 20% circa dei casi (Mullighan CG. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012) sono presenti mutazioni che causano l'attivazione di vie tirosin chinasiche implicate nella trasmissione del segnale intracellulare (*CRLF2*, *IL7R*, *JAK1* e *JAK2*).

Tra le alterazioni sopra citate, quelle a carico di *IKZF1* rivestono un'importanza particolare. Questo gene, che codifica per il fattore di trascrizione Ikaros, necessario per lo sviluppo della cellula linfoide, può essere interessato da delezioni e più raramente mutazioni, che ne causano la perdita di funzione. Lesioni di *IKZF1* sono presenti in più del 70% dei casi di LAL B *BCR/ABL1+*, e possono interessare sia casi all'esordio di malattia, che progressioni di leucemia mieloide cronica in crisi blastica. La presenza di alterazioni di questo gene si associa a prognosi sfavorevole, elevata incidenza di recidive di malattia ed aumentato rischio di fallimento terapeutico (Martinelli G. *et al*, J Clin Oncol. 2009; Mullighan CG. *et al*, N Engl J Med. 2009). In particolare, numerosi studi hanno evidenziato la presenza di alterazioni di *IKZF1* in casi di LAL che pur non presentando il trascritto di fusione, mostrano un profilo di espressione genica simile alle LAL *BCR/ABL1+*, e per questo denominate *BCR/ABL1-like*. Questo sottogruppo comprende circa il 15% delle LAL B del bambino ed un terzo di quelle dell'adulto (Mullighan CG. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012) ed è associato ad un andamento sfavorevole. Circa la metà dei casi *BCR/ABL1-like* presentano riarrangiamenti del gene *CRLF2* (vedi oltre) e mutazioni concomitanti dei geni *JAK 1* e *2*. Recentemente, studi di *whole genome sequencing* hanno dimostrato nei casi *BCR/ABL1-like* privi di riarrangiamenti di *CRLF2*, la presenza di mutazioni attivanti citochine recettoriali e tirosin chinasi quali *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB* ed *IL7R*. Ciò rende questo gruppo di pazienti un bersaglio interessante di farmaci inibitori delle tirosin chinasi (TKI).

Recentemente, numerosi studi effettuati principalmente su coorti pediatriche, si sono concentrati sulla valutazione delle alterazioni a carico del gene *CRLF2* e sul loro impatto clinico. Questo gene, che codifica per il recettore della linfopoietina stromale timica, è alterato nel 5-15% delle LAL B che non presentano i comuni riarrangiamenti molecolari, ed

in più del 50% dei casi di leucemia associata a Sindrome di Down. Il valore prognostico di queste alterazioni resta tuttora controverso; un'associazione con prognosi sfavorevole sembra essere legata alla presenza concomitante di mutazioni di *IKZF1*, specialmente nei casi con Sindrome di Down. Le alterazioni di questo gene verranno trattate nel dettaglio nei capitoli seguenti.

Mutazioni a carico del gene *TP53* sono state evidenziate sia nelle LAL a fenotipo B che T: nel bambino, sono più frequentemente acquisite alla recidiva di malattia (6.4% e 11.1% rispettivamente) e sembrano correlare con una riduzione della *disease free survival* (DFS) e dell'*overall survival* (OS) (Hof J. *et al*, J Clin Oncol. 2011; Krentz S. *et al*, Leukemia 2013); nell'adulto, uno studio condotto dal nostro gruppo ha mostrato una maggiore frequenza delle mutazioni nelle LAL a fenotipo T e nei casi in cui l'analisi molecolare risultava negativa per i geni di fusione ricorrenti, in associazione ad una mancata risposta al trattamento (Chiaretti S. *et al*, Haematologica 2013).

Gene	Alterazione	Frequenza	Rilevanza clinica
<i>IKZF1</i>	delezioni focali mutazioni variante ereditarie	>70% LAL <i>BCR/ABL1+</i> ~ 1/3 LAL <i>BCR/ABL1-</i>	Prognosi sfavorevole Incidenza di recidive triplicate Incrementato rischio di sviluppare leucemia
<i>PAX5</i>	delezioni focali mutazioni traslocazioni	~ 35 LAL B	Non associazione con prognosi
<i>CRLF2</i>	riarrangiamenti molecolari mutazioni	5-16% LAL B adulte e pediatriche;>50% LAL B associate a DS	Prognosi sfavorevole in associazione con <i>IKZF1</i> , specialmente in LAL con DS
<i>JAK1/2</i>	mutazioni nel dominio chinasico e pseudochinasico	18-35% LAL B associate a DS; 10% LAL <i>BCR/ABL1-</i> ad alto rischio	Possibile target terapeutico per utilizzo di farmaci inibitori
<i>CREBBP</i>	delezioni focali mutazioni	19% LAL B in recidiva - acquisito alla recidiva	Associazione con resistenza ai glucocorticoidi
<i>TP53</i>	Mutazioni/delezioni	~12% LAL B spesso acquisito alla recidiva	Prognosi sfavorevole

**Tabella 3-** Alterazioni genetiche ricorrenti identificate nelle LAL B aventi un ruolo nel processo di leucemogenesi, con relativa frequenza e significato clinico.

Per quel che riguarda le LAL a fenotipo T, invece, le mutazioni più frequentemente rilevate sono quelle a carico del gene *NOTCH1*. Questo gene codifica per un recettore transmembrana implicato nel processo di normale emopoiesi, dove agisce regolando il differenziamento dei progenitori linfoidei in senso T. Frequentemente queste mutazioni si presentano in associazione ad alterazioni del gene *FBXW7*, rilevate nell'8-16% dei casi circa.

Nonostante numerosi studi si siano occupati di definire il ruolo prognostico delle mutazioni di *NOTCH1* e *FBXW7*, questo rimane ad oggi controverso: mentre alcuni studi sostengono che le mutazioni di *NOTCH1* e/o *FBXW7* definiscano un gruppo di pazienti a buona prognosi, altri non riscontrano differenze tali da giustificare trattamenti terapeutici diversi rispetto ai casi non mutati.

Altri geni che possono essere interessati da mutazioni sono *JAK1*, *PTEN* e *WT1*, riportate rispettivamente nel 3-27%, 8-13% e 8% di casi. Le mutazioni di *JAK1* si riscontrano prevalentemente nei pazienti adulti e sono associate ad una aumentata espressione dei geni della via del segnale *JAK/STAT*. I casi mutati per *JAK1* mostrano una scarsa risposta alla terapia mentre l'effetto sulla prognosi delle mutazioni di *PTEN* e *WT1* è ancora oggetto di studio. Mutazioni a carico del gene *PHF6* sono state riportate nel 16% dei casi di LAL T pediatriche e nel 38% di quelle dell'adulto (Van Vlierberghe P. *et al*, Nat Genet. 2010), ma anche in questo caso il loro significato prognostico resta ancora da chiarire. Sono state inoltre evidenziate variazioni del numero di copie, ossia amplificazioni e delezioni, a carico dei geni *MYB*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *RB1*. Infine, è stato recentemente dimostrato che l'acquisizione alla recidiva di malattia, di mutazioni a carico del gene *NT5C2* correla con un aumentata resistenza al trattamento ed un andamento clinico sfavorevole (Tzoneva G. *et al*, Nat Med. 2013; Meyer JA. *et al*, Nat Genet. 2013).

## 1.4 Fattori prognostici e cenni di terapia

Nell'inquadramento della leucemia acuta linfoide, la valutazione di alcuni parametri, sia clinici che biologici, consente di definire diverse categorie di rischio, sulla base delle quali stabilire il trattamento adatto al caso. L'accurata collocazione di ogni paziente nella categoria di rischio adeguata, consente di assegnare ad ognuno il trattamento corretto, evitando così di esporre pazienti a basso rischio a dei regimi intensivi non necessari, e viceversa consentendo l'utilizzo di trattamenti più aggressivi nei casi che presentano fattori prognostici sfavorevoli riconosciuti. Negli ultimi anni è dunque divenuta evidente la necessità di identificare gruppi di pazienti che possano avere un andamento clinico sfavorevole, attraverso l'individuazione di nuovi marcatori molecolari che si potessero affiancare ai fattori prognostici usati comunemente.

Nella stratificazione prognostica dei pazienti affetti da LAL è dunque necessario tenere in considerazione numerosi fattori: tra i parametri clinici si devono considerare in particolare età, conta dei globuli bianchi all'esordio di malattia, coinvolgimento multi organo ed interessamento del sistema nervoso centrale (SNC); tra i fattori biologici troviamo invece parametri immunologici (fenotipo delle cellule leucemiche), citogenetici e molecolari (presenza di trascritti di fusione).

Fattori prognostici sfavorevoli riconosciuti sono rappresentati da un'età inferiore ad un anno di vita, oppure  $\geq 60$ , la presenza di una conta leucocitaria  $\geq 50 \times 10^9/L$  alla diagnosi della patologia, il sesso maschile ed il fenotipo T (Rubnitz JE. *et al*, Cancer 2013). Negli adulti esiste una prevalenza maggiore di sottotipi sfavorevoli (*BCR/ABL1* e riarrangiamenti del gene *MLL*) e minore di quelli favorevoli (*ETV6/RUNX1* ed iperdiploidia), rispetto a quanto avviene nei bambini (Bhojwani D. *et al*, Leukemia 2012; Inaba H. *et al*, Lancet 2013). Essi presentano inoltre una tolleranza minore ai trattamenti chemioterapici a causa di patologie intercorrenti oppure ad uno scadimento delle condizioni generali. Un gruppo particolare è rappresentato dagli adolescenti e giovani adulti (*adolescent and young adults-AYA*), cioè i pazienti di età compresa tra i 18 ed i 35 anni. Questi ultimi sono attualmente oggetto di numerosi studi clinici, poiché sembrano avere caratteristiche biologiche intermedie tra adulti e bambini e ottenere risultati migliori se trattati con regime terapeutici intensivi, come quelli pediatrici (Pui CH. *et al*, J Clin Oncol. 2011 ).

In generale, il trattamento della LAL si articola in tre fasi fondamentali: la terapia di induzione, quella di consolidamento/intensificazione ed il mantenimento (. È inoltre prevista una profilassi per evitare recidive al livello del SNC, attraverso la somministrazione diretta di farmaci in sede intratecale (Pui CH. *et al*, N Engl J Med 2006; Pui CH. *et al*, Lancet Oncol. 2008).

Molti dei farmaci oggi inclusi nell'armamentario terapeutico sono utilizzati fin dagli anni '70, ma dosaggi e schemi di somministrazione sono stati ottimizzati negli anni sulla base della risposta al trattamento, delle caratteristiche biologiche della cellula e di studi di farmacogenomica e di farmacodinamica.

La terapia di induzione mira ad eliminare più del 99% delle cellule leucemiche ed a ristabilire l'emopoiesi normale in un periodo di circa 4-6 settimane. Ad oggi, l'ottenimento della remissione completa viene raggiunto nel 96-99% dei bambini e nel 78-92% degli adulti (Pui CH *et al*, Lancet 2008; Hunger SP. *et al*, J Clin Oncol 2012). Questo approccio terapeutico di base può subire delle modifiche, come avviene per i pazienti affetti da LAL *BRC/ABL*+. In questi casi la terapia di induzione si avvale dell'uso di farmaci inibitori delle tirosinchinasi (Imatinib o Dasatinib), usati in monoterapia oppure in combinazione con i farmaci classici. L'introduzione degli inibitori ha portato all'ottenimento della remissione completa in circa più del 90% dei casi (Thomas DA *et al*, Blood 2004; Vignetti M. *et al*, Blood 2007; Foà R. *et al*, Blood 2011; Schultz KR. *et al*, Leukemia 2014).

Una volta ottenuta la remissione completa e ristabilita la normale emopoiesi, si procede con la fase di consolidamento/intensificazione che mira all'eradicazione di eventuali cellule leucemiche residue ed a prevenire l'insorgenza di recidive di malattia. Si prosegue poi con il mantenimento, che ha una durata di circa 2 anni.

Il trapianto allogenico in prima remissione è oggi indicato esclusivamente in quei pazienti che hanno caratteristiche di alto rischio, ad esempio le LAL B *BCR/ABL1*+ oppure i pazienti con una scarsa risposta iniziale al trattamento. Il trapianto autologo di cellule staminali, per la minore tossicità, può essere indicato anche in età adulta, ma le indicazioni terapeutiche vanno ricercate in gruppi selezionati di pazienti e tenendo conto della valutazione della remissione completa, anche a livello molecolare.

La profilassi del SNC viene iniziata durante la fase di induzione e prosegue durante tutto il trattamento, attraverso la somministrazione di punture lombari medicate oppure cicli di

radioterapia. Fattori associati ad un rischio aumentato di recidive al livello del SNC sono rappresentati dal fenotipo T, dalla presenza di iperleucocitosi alla diagnosi ed ovviamente dalla presenza di cellule leucemiche nel liquido cefalorachidiano all'esordio della malattia (Pui CH. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006).

Questo schema di trattamento generale viene utilizzato sia per i pazienti adulti che per quelli pediatrici, ma in questi ultimi i regimi terapeutici sono più intensivi, sia per quanto riguarda i dosaggi dei farmaci che per il minor intervallo di tempo che intercorre tra le varie fasi.

Grazie all'entrata in uso di questi schemi polichemioterapici, oggi è possibile guarire circa l'80% dei bambini affetti da LAL. Negli adulti invece, la guarigione viene ottenuta solamente dal 40% dei pazienti: questo a causa della minore *compliance* al trattamento, della maggiore tossicità dovuta ad insufficienze multiorgano, a patologie collaterali ed alle differenze biologiche che caratterizzano la cellula neoplastica.

## Capitolo 2

### Next generation sequencing

#### 2.1 Introduzione

Descritta per la prima volta da Sanger et al. nel 1977 (Sanger F *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1977), la tecnologia del sequenziamento di DNA ha subito nell'ultimo decennio un'incredibile metamorfosi, grazie all'introduzione di metodiche di sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing-NGS*) capaci di produrre, in un unico esperimento, un elevatissimo numero di sequenze a costi relativamente contenuti ed in tempi rapidi. Queste metodiche hanno rappresentato una vera e propria rivoluzione nella ricerca biologica e biomedica, consentendo di osservare fenomeni biologici ad un livello di dettaglio finora impensabile.

La scoperta dell'uso dei di-deossi nucleotidi applicati al metodo a terminazione di catena sviluppato da Sanger ha segnato una pietra miliare nella storia del sequenziamento del DNA. Questo concetto ha fornito una base per lo sviluppo di sistemi automatizzati Sanger, che per quasi 20 anni è stato il metodo di scelta per il sequenziamento del DNA. La tecnologia è stata progressivamente migliorata, fino a supportare il sequenziamento simultaneo di 1000 paia di basi (bp) per frammento di DNA in 96 capillari. L'utilizzo di questa tecnologia è stato alla base del Progetto Genoma Umano, finanziato nel 1990 con l'obiettivo di determinare i tre miliardi di paia di basi che costituiscono il genoma umano. Sono stati impiegati circa dieci anni per la produzione di una prima bozza di risultati (Lander ES. *et al*, Nature 2001; Venter JC. *et al* Science 2001) e ulteriori tre anni per il completamento del progetto.

Durante la fase finale e i primi anni successivi, sono stati avviati numerosi altri studi, tra cui il Progetto Internazionale HapMap ed il 1000 Genomes Project. Quest'ultimo si è concentrato sul sequenziamento dei genomi di almeno mille partecipanti anonimi, appartenenti a gruppi etnici diversi, in modo da fornire una adeguata variabilità genetica umana. Grazie all'impiego di tecniche sempre più veloci ed economiche, nell'Ottobre 2012, è stato raggiunto il sorprendente traguardo del sequenziamento di 1092 genomi.



## 2.2 Principi della tecnica

La NGS viene anche detta *high-throughput sequencing* (sequenziamento ad alta resa) poiché consente, a differenza del sequenziamento tradizionale col metodo Sanger, di sequenziare numerosi frammenti in parallelo. È importante considerare che, riducendo l'estensione della porzione di genoma da analizzare, si aumenta la profondità e quindi la sensibilità dell'analisi. Questa tecnologia ha diverse applicazioni, che dipendono dal tipo di informazione che si vuole ottenere:

- *Whole-Genome Sequencing* (WGS), sequenziando l'intero genoma, permette l'identificazione di variazioni presenti sia nelle regioni codificanti che in quelle non codificanti. Questa tecnica viene utilizzata per la scoperta di nuove mutazioni (*discovery*) all'interno dell'intero patrimonio genetico dell'individuo, ed in eventuali screening successivi.
- *Whole-Exome Sequencing* (WES), consente il sequenziamento della sola porzione codificante del genoma: come il WGS questa tecnica viene utilizzata negli studi di *discovery* ed in eventuali screening successivi.
- *RNA Sequencing* (RNASeq), permette il sequenziamento del trascrittoma, ossia quella porzione di genoma che viene trascritto in mRNA ed è quindi effettivamente espresso nella cellula. Mentre genoma ed esoma sono uguali in ogni cellula, il trascrittoma è tessuto-specifico. Questa tecnica è particolarmente indicata negli studi di *discovery*, nell'ambito di patologie che interessano un determinato organo o tessuto.
- *Amplicon sequencing*: a differenza dei metodi precedenti, viene utilizzato negli studi che prevedono lo screening mutazionale in determinati geni o porzioni di geni selezionati per la loro correlazione con una determinata malattia, o per la presenza di mutazioni patogenetiche identificate mediante studi di *discovery*.

Esistono diversi sistemi di NGS sviluppati da diverse compagnie, che tuttavia condividono almeno tre fasi fondamentali: la preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta *sequencing library*), la reazione di amplificazione e la reazione di sequenziamento.

La preparazione del campione consiste nella suddivisione del genoma in numerosi frammenti di lunghezza contenuta, che a seconda del metodo utilizzato, possono essere successivamente amplificati con tecniche differenti. Il campione di DNA viene preparato attraverso un processo di frammentazione casuale, ai frammenti ottenuti vengono aggiunte delle sequenze predefinite (note come adattatori o *adaptors*) che sono necessarie per ancorare e immobilizzare i frammenti al supporto sul quale avrà luogo la reazione di sequenziamento. I frammenti di DNA così preparati tramite l'aggiunta degli adattatori costituiscono la cosiddetta libreria di sequenziamento (*sequencing library*). Esistono almeno tre diversi tipi di adattatori e quindi tre diversi modi di preparare la *sequencing library*: adattatori lineari, adattatori circolari e adattatori a bolla. Esistono naturalmente anche tipi di supporto di ancoraggio diversi.

La fase di amplificazione può essere realizzata con metodi differenti, a seconda del sistema utilizzato: si può avere una reazione di PCR in emulsione oppure un'amplificazione detta "a ponte". Nell'amplificazione realizzata in emulsione, un singolo frammento di DNA viene incorporato in una microscopica bolla di acqua insieme ad una biglia, alla quale si lega. La reazione di PCR avviene contemporaneamente in ognuna delle migliaia di micro bolle presenti nell'emulsione, portando alla generazione di milioni di copie clonali di ogni singolo frammento di DNA.

Invece, nella reazione di amplificazione detta a ponte (*bridge amplification*), i filamenti singoli ottenuti dalla denaturazione della *sequencing library* vengono innestati in una cella a flusso (*flowcell*), dove ha luogo la reazione che porta alla formazione di gruppi (*clusters*) di frammenti clonali di DNA.

Il sequenziamento vero e proprio avviene grazie a complessi meccanismi fluidici che regolano il flusso dei reagenti che vanno a cimentarsi col DNA immobilizzato. Ogni ciclo di sequenziamento espone il DNA immobilizzato ad una soluzione contenente un nucleotide, ed un successivo lavaggio: nel caso in cui il nucleotide testato sia complementare alla sequenza, esso viene incorporato producendo un evento molecolare, ad esempio, nelle metodiche basate sul pirosequenziamento, un segnale luminoso. La registrazione di tale evento avviene, nella maggior parte delle tecniche, attraverso un sistema per immagini. Fanno eccezione al sistema di registrazione per immagini, le macchine basate su un sistema di rilevazione con semiconduttore, che riconosce l'emissione di ioni idrogeno che vengono

rilasciati durante la reazione di polimerizzazione del DNA. Come precedentemente detto, i sistemi NGS sono anche detti *high-throughput*, perché tutti i frammenti immobilizzati sul supporto di sequenziamento vengono sequenziati in parallelo, a differenza di quanto avviene del Sanger sequencing tradizionale, che consente di sequenziare un solo frammento alla volta.

Nella Tabella 4 sono brevemente descritte le caratteristiche e le performance raggiunte dai sistemi di NGS in commercio.

	<b>Sanger</b>	<b>454 Roche</b>	<b>Illumina</b>	<b>SOLiD</b>
<b>Tecnologia</b>	Sintesi in presenza di terminatori di catena	Pirosequenziamento su support solido	Sequenziamento basato su sintesi tramite polimerasi	Sequenziamento massivo basato su ligazione
<b>Amplificazione</b>	PCR	PCR in emulsione	Amplificazione a ponte	PCR in emulsione
<b>Lunghezza della read</b>	900 bp	200-300 bp	30-40 bp	35 bp
<b>Bp per run</b>	96 kb	80-120 Mb	1300 Mb	1000-3000 Mb
<b>Tempo/run</b>	1 giorno	7 ore	4 giorni	5 giorni

**Tabella 4-** Confronto tra le caratteristiche e le performance delle diverse piattaforme utilizzate per NGS.

### 2.3 Sistema GS Junior 454

Il GS Junior 454 è stato il primo sequenziatore per NGS lanciato sul mercato nel 2005. Il sistema si basa sulla tecnologia del pirosequenziamento, così chiamato per la presenza di pirofosfati che vengono sfruttati nella reazione di sequenziamento. Il procedimento, come per tutte le metodiche di NGS, si articola in tre fasi: preparazione della *sequencing library*, reazione di amplificazione e sequenziamento.

Il materiale di partenza può essere costituito da DNA genomico, da prodotti di PCR oppure da cDNA. Durante la prima fase viene creata la DNA *library*, attraverso una reazione di PCR che prevede l'uso di speciali *primers* di fusione (Figura 3). Questi ultimi sono costituiti da *primers* specifici per la sequenza di interesse a cui sono legati degli adattatori e delle sequenze dette MID (*Multiplex identifier*). Queste ultime sono paziente-specifiche, per consentire di distinguere i diversi campioni inclusi nello stesso esperimento. Gli adattatori sono invece necessari nella fase di emulsion PCR (vedi sotto). Gli adattatori si appaiano sia ai *primers* di amplificazione, che a quelli di sequenziamento.

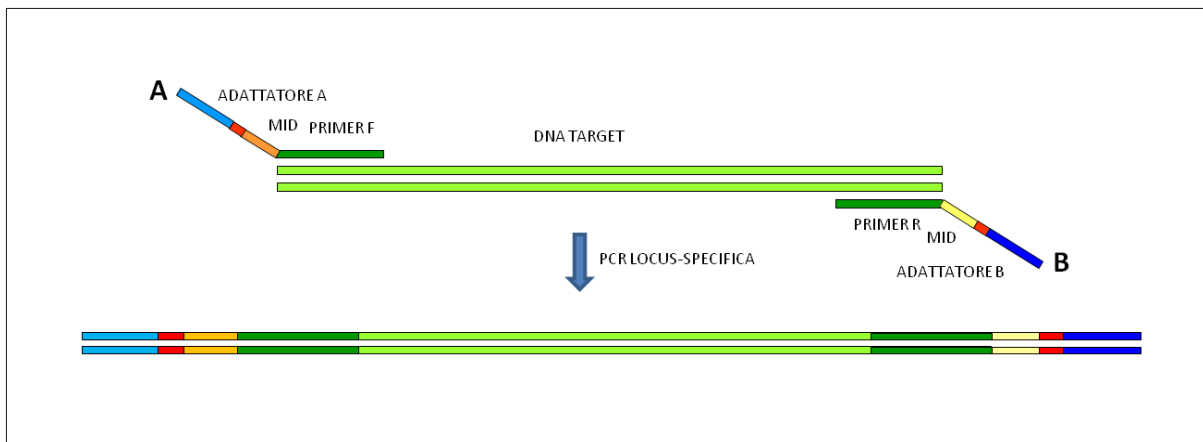
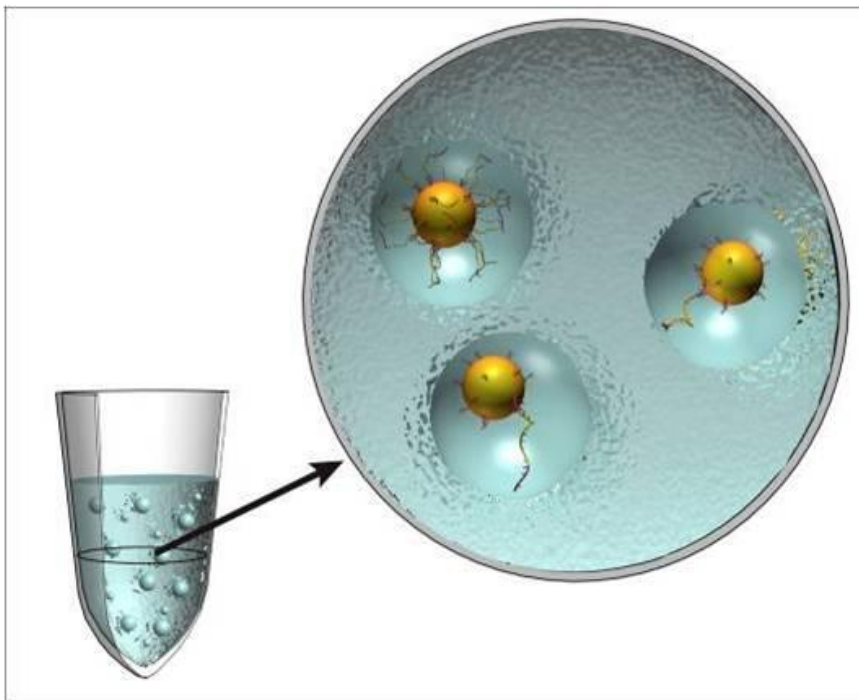


Figura 3- Schema riassuntivo della realizzazione di una *library*.

Quello che segue è un processo cosiddetto di PCR in emulsione (*emulsion PCR*). La libreria di DNA funge da template per la PCR in emulsione. Quest'ultima permette di amplificare all'interno della stessa provetta una grande quantità di frammenti di DNA. In questo passaggio vengono utilizzate apposite biglie sulla cui superficie sono presenti sequenze oligonucleotidiche complementari ad uno degli adattatori legati al DNA.

I frammenti della libreria vengono mescolati con un eccesso di biglie in modo tale che ogni biglia si legherà ad un solo frammento di DNA. L'emulsione viene creata mescolando opportunamente la mix di PCR con un olio minerale; si creano così delle micelle di pochi  $\mu\text{l}$  di mix di PCR in emulsione nell'olio. Ogni micella contenente una biglia e si comporta da micro reattore, infatti alla fine sulla superficie della biglia saranno presenti fino a 10 milioni di copie del frammento. Così facendo si può ottenere l'amplificazione di uno specifico frammento senza la necessità di effettuare clonaggio in batteri, infatti l'intera collezione di frammenti viene amplificata contemporaneamente in una stessa provetta. Successivamente saranno purificate tutte le biglie cariche ovvero quelle che effettivamente hanno legato il frammento di DNA e che sono andate incontro al processo di amplificazione (Figura 4).



**Figura 4-** Emulsion-PCR: all'interno di ogni microbolla creata nell'olio di emulsione si colloca una biglia, che ha legato un singolo filamento di DNA. Sulla superficie di ogni biglia avviene l'amplificazione, che porta alla formazione di milioni di copie di ciascun frammento.

Gli amplificati così ottenuti vengono posti su un supporto (*picotiter plate*) sul quale avviene la reazione di sequenziamento vera e propria. La piastra è costituita da circa 1,6 milioni di pozzetti aventi un diametro tale da poter contenere un'unica biglia carica (Figura 5).

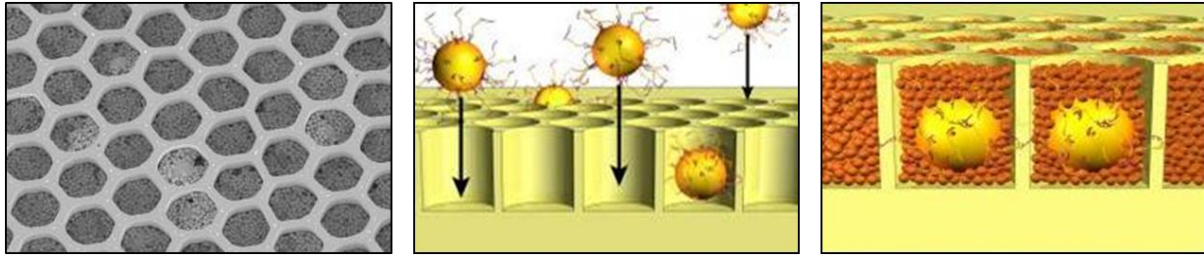


Figura 5-Rappresentazione grafica della *picotiter plate*.

Dopo aver caricato le biglie ed i reagenti nella piastra, questa viene posizionata nello strumento di fronte ad una fotocamera ad alta risoluzione. Nello strumento è presente una camera di flusso che fa fluire i deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) perpendicolarmente ai pozzetti della piastra, in maniera sequenziale e seguendo un ordine prefissato (T-A-C-G). Ogni qualvolta avviene l'incorporazione di un nucleotide in un pozzetto, si ha un'emissione luminosa che passa attraverso il fondo e viene catturata dalla camera. Le reazioni che avvengono in ogni pozzetto della piastra sono rilevate e registrate in maniera continua ed in contemporanea per tutti i pozzetti.

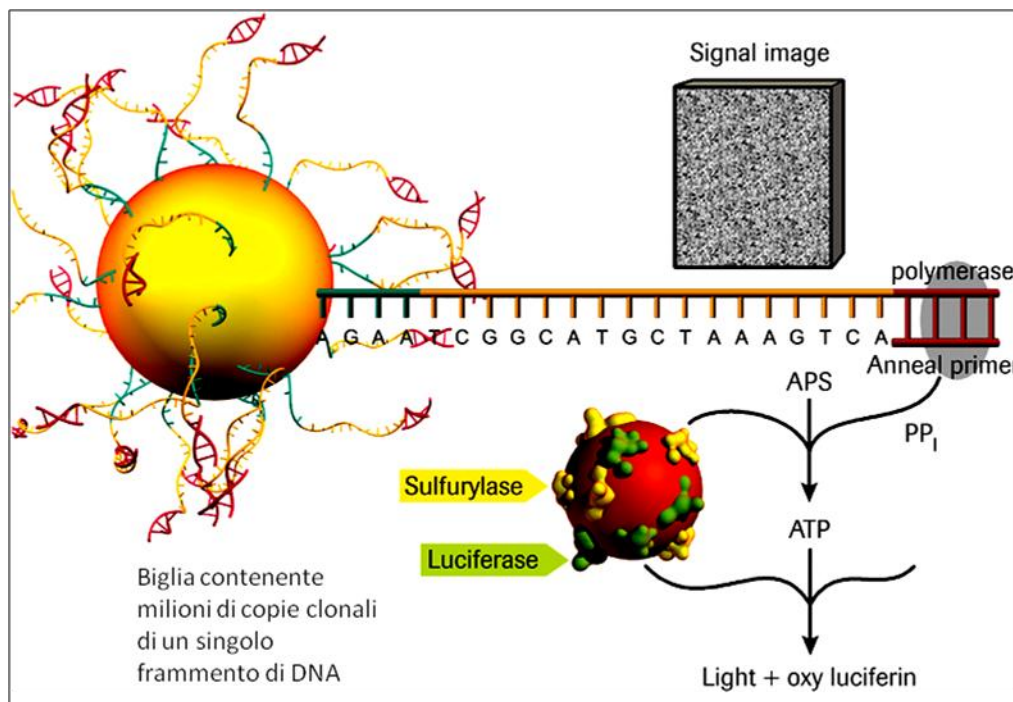
Questo metodo è detto pirosequenziamento, poiché si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato (Figura 6). La tecnica consta di 5 passaggi principali:

1. La sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata con la PCR, viene incubata come singola elica insieme agli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi e ai substrati adenosinolfosfato e luciferina.
2. Uno dei quattro dNTP è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare con il residuo del template. In tal caso si ha concomitante liberazione di pirofosfato inorganico (PPi).
3. Il PPi così prodotto viene trasformato in ATP, ad opera della solforilasi e usando l'ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossiluciferina ad opera della luciferasi con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato dall'apposita camera fotosensibile.

4. L'enzima apirasi degrada il dNTP che non è stato incorporato, e l'ATP prodotto dalla solforilasi. Solo quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione (ritornando al punto 1).

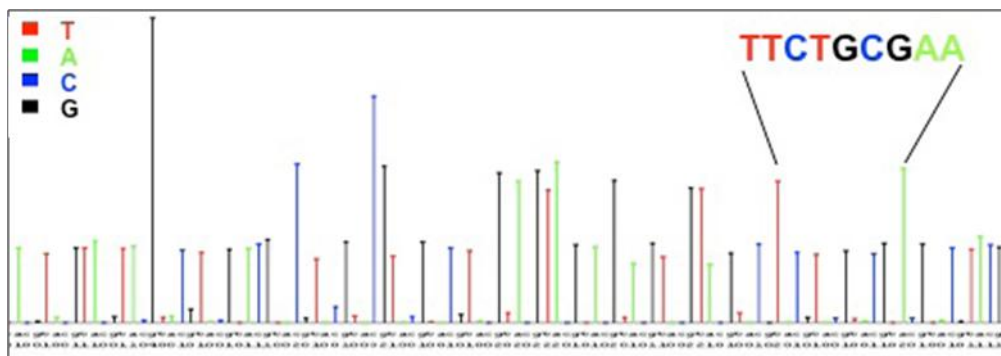
5. Si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i dNTP fino alla deduzione completa della sequenza

Il segnale luminoso prodotto ogni volta dalla luciferina viene registrato in un apposito "pirogramma". Il segnale sarà quindi proporzionale all'ATP prodotto e dunque al nucleotide inglobato; un picco di intensità doppia, ad esempio, rileva che nello stesso ciclo sono stati inglobati 2 dNTP (ripetizione della stessa base sul template). Viceversa un segnale nullo indica che il dNTP aggiunto in quel ciclo non è complementare.



**Figura 6-** Schema riassuntivo delle varie fasi del pirosequenziamento: ogni volta che la polimerasi catalizza il legame di una base complementare alla sequenza template viene liberato pirofosfato inorganico (PP<sub>i</sub>). Questo viene utilizzato per produrre ATP, che consente la conversione di luciferina in ossiluciferina con liberazione di un segnale luminoso, che viene captato dalla camera fotosensibile. L'enzima catalizzatore di questa reazione è la luciferasi.

L'analisi delle immagini associata all'ordine dei flussi permette di costruire il fluogramma di ciascun pozzetto. In altre parole, durante il flusso di T, ci sono pozzetti in cui la T, risultando complementare, viene incorporata; di conseguenza la reazione di pirosequenziamento emetterà una luce che viene registrata dalla camera. A questo seguirà il flusso di A, C e G che generano a loro volta le rispettive immagini. Infine, il software elabora tutte le immagini e converte i dati grezzi in un fluogramma in cui l'intensità della luce emessa è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati (Figura 7).



**Figura 7**-Esempio di fluogramma

Per quanto diversificate siano le tecnologie di sequenziamento, tutte forniscono come output delle sequenze (*reads*) di lunghezza variabile, da decine a diverse centinaia di basi. L'analisi bioinformatica che segue si divide in tre fasi: allineamento, che ricerca corrispondenze tra le *reads* e il genoma di riferimento, *variant calling*, che tenta di distinguere le varianti dovute ad errori genetici da quelle causate da errori strumentali compiuti nell'analisi, filtraggio e annotazione, che tentano di allineare le *reads* al genoma di riferimento.

L'allineamento è il processo attraverso cui si mappano le *reads* ottenute dal processo di sequenziamento, su un genoma di riferimento. Si tratta di un compito complesso, svolto attraverso l'uso di software bioinformatici che confrontano ogni posizione sulla sequenza con ogni posizione del DNA di riferimento. Dopo essere stato allineato, il DNA analizzato deve essere confrontato con la sequenza di riferimento *wildtype*: in questo momento si ha la possibilità di individuare eventuali variazioni presenti sulla sequenza in analisi. Tali varianti possono essere reali, cioè vere e proprie differenze esistenti tra la sequenza in esame e quella di riferimento, oppure dei falsi positivi, dovuti alla presenza di artefatti della



metodica. La causa dei falsi positivi può essere rappresentata dalla presenza di indels, ovvero fenomeni di inserzioni o delezioni, oppure da errori compiuti nella fase di preparazione delle sequenze, o a problemi nella reazione di PCR.

A questo punto, ciò che si ottiene è una lista di varianti che rappresentano tutte le differenze trovate tra la sequenza testata e quella di riferimento. Il passaggio finale è quello di distinguere quali di queste variazioni abbiano un ruolo nella patogenesi e nello sviluppo della patologia studiata, avvalendosi dei numerosi database esistenti.

## 2.4 NGS in ematologia

Le malattie ematologiche sono caratterizzate da una mole elevata di alterazioni geniche, alcune aventi significato patogenetico riconosciuto, sebbene inferiore a quelle identificate nelle neoplasie solide. L'utilizzo delle tecnologie di NGS ha consentito, negli ultimi anni, di identificare numerose mutazioni *driver* in diverse patologie onco-ematologiche. Un caso emblematico è quello della leucemia a cellule capellute, dove una mutazione a carico del gene *BRAF* è stata riscontrata in tutti i pazienti analizzati mediante WES (Tiacci E. *et al*, N Engl J Med. 2011). Anche nel caso della LLC, la forma più comune di leucemia nei paesi occidentali, gli studi di NGS hanno identificato delle mutazioni a carico di geni come *NOTCH1*, *SF3B1* e *BIRC3*, che hanno consentito di migliorare la stratificazione prognostica dei pazienti (Rossi D. *et al*, Blood 2013; Fabbri G. *et al*, J Exp Med 2011). Per quanto riguarda la LAL gli studi di NGS si sono maggiormente concentrati sulla valutazione di quei sottogruppi considerati a prognosi sfavorevole, come i pazienti affetti da LAL a fenotipo T, gli ipodiploidi ed i cosiddetti "ad alto rischio", come i *BCR/ABL1*-like. In questi ultimi, come detto in precedenza, sono state identificate mutazioni a carico del gene *CRLF2* e di altri geni appartenenti al pathway *JAK-STAT*, che possono rappresentare la base per l'utilizzo di inibitori specifici in nuovi protocolli clinici (Roberts KG. *et al*, Cancer Cell. 2012).

Recenti studi hanno inoltre identificato una mutazione ricorrente a carico del gene *PAX5* in due distinti casi di leucemia familiare (Shah S. *et al*, Nat. Genet. 2013). Ciò risulta di grande interesse nella definizione delle alterazioni genetiche che possono influenzare la suscettibilità dell'individuo allo sviluppo di una leucemia.

Un contributo particolarmente rilevante è stato fornito dall'introduzione delle tecnologie di NGS nell'inquadramento della LAM: in questa patologia sono infatti state identificate mutazioni a carico di diversi geni rilevanti per il loro impatto prognostico e patogenetico. Le prime ad essere identificate con queste metodiche sono state le mutazioni a carico dei geni *IDH1/IDH2*: queste alterazioni sono riportate nel 15% dei pazienti affetti da LAM con cariotipo normale e si associano ad una riduzione dell'OS e della DFS (Paschka P. *et al*, J Clin Oncol. 2010). Mutazioni del gene *DNMT3A* sono state invece evidenziate nel 20-22% dei pazienti adulti affetti da LAM *de novo*, e sembrano correlare ad un andamento sfavorevole nel gruppo di pazienti a rischio intermedio (Ley TJ. *et al*, N Engl J Med 2010). Altre alterazioni evidenziate grazie alle tecniche di sequenziamento di nuova generazione sono quelle a

carico dei geni *BCOR* e *TET2* (Grossmann V. *et al*, Blood 2011; Delhommeau F. *et al*, N Engl J Med 2009).

Inoltre, grazie all'introduzione del NGS è stato possibile postulare un modello per le LAM che può essere riassunto come segue: 1) un numero esiguo di mutazioni è necessario per lo sviluppo della LAM; 2) queste mutazioni avvengono in una cellula staminale emopoietica che, con il progredire dell'età, accumula un numero aggiuntivo di mutazioni; 3) l'acquisizione ulteriore di mutazioni "cooperanti"(da 1 a 5) determina la trasformazione in leucemia; 4) le mutazioni generalmente coinvolgono geni patogeneticamente rilevanti, come ad esempio fattori di trascrizione (18%), *NPM1* (27%), oncosoppressori (16%), geni attivi nelle vie di trasmissione del segnale (59%), nei processi di metilazione del DNA (44%) e di modificazione della cromatina (30%); 5) l'acquisizione di mutazioni aggiuntive porta allo sviluppo di un subclone che potrebbe essere responsabile di una eventuale ripresa di malattia (Welch JS. *et al*, Cell 2012; Cancer Genome Atlas Research Network, N Engl J Med 2013).

Nella Tabella 5 sono riportate alcune delle mutazioni rilevate attraverso tecniche di NGS nelle principali patologie onco-ematologiche.

Patologia ematologica	Alterazione genica
LAL T	<i>PHF6, CNOT3, RPL10</i>
LAL "alto rischio"	<i>CRLF2, JAK, IKZF1</i>
LAL ipodiploidi	<i>IKZF2, TP53, NF1, PTPN11, NRAS, KRAS</i>
LAL in recidiva	<i>CREBBP, TP53</i>
LAL familiari	<i>TP53, PAX5</i>
LLC	<i>NOTCH1, SF3B1, BIRC3, MYD88</i>
LCC	<i>BRAF</i>
LAM	<i>IDH1-2, BCOR, DNMT3A, TET2</i>

**Tabella 5-** Alcune delle principali alterazioni geniche identificate nelle patologie ematologiche attraverso l'uso di NGS.

## Capitolo 3

### Progetto 1- Valutazione dell'espressione del gene *CRLF2* in pazienti adulti affetti da leucemia acuta linfoide B

#### 3.1 Introduzione

Nonostante i recenti progressi ottenuti nel trattamento della leucemia acuta linfoide dell'adulto, un elevato numero di pazienti va tuttora incontro a recidiva di malattia. Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi, al fine di identificare nuovi marcatori molecolari da utilizzare sia per una più accurata stratificazione dei pazienti in sottogruppi prognostici, che come target terapeutici mirati.

Ciò è particolarmente importante nell'ambito delle LAL senza alterazioni molecolari note, categoria per la quale la ricerca di nuovi marcatori genetico-molecolari appare determinante. Un gene, recentemente emerso dagli studi di GEP e NGS ed ancora in corso di investigazione è *CRLF2*.

Il gene *CRLF2* (*Cytokine Receptor-Like Factor 2*) è localizzato a livello della regione pseudoautosomiale PAR1 dei cromosomi sessuali, in posizione Xp22.3 e Yp11.3. Esso costituisce, insieme al recettore per l'interleuchina 7 (*ILR7*), il recettore eterodimerico per la linfopoietina stromale timica (TSLP). Quest'ultima è una citochina secreta dalle cellule dell'epitelio intestinale e bronchiale, dai cheratinociti e dalle cellule stromali ed agisce come mediatore nei processi infiammatori e nelle reazioni allergiche. I suoi livelli si trovano incrementati in patologie quali asma e dermatiti atopiche.

Il legame di questa molecola al complesso recettoriale attiva la via di *STAT3*, *STAT5* e *JAK2*, coinvolti nel controllo dei processi di proliferazione cellulare e di sviluppo del sistema emopoietico (Russell LJ. *et al*, Blood 2009; Yoda A. *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 2010).

Un'espressione aberrante di *CRLF2* può essere ricondotta a tre differenti eventi molecolari:

- una delezione interstiziale [del(X)(p22.33p22.33)] o [del(Y)(p11.32;q11.32)] che porta alla formazione del trascritto *P2RY8/CRLF2*, con giustapposizione del gene al promotore di *P2RY8*;
- una traslocazione t(X;14)(p22;q32) o t(Y;14)(p11;q32) con formazione del trascritto *IGH@CRLF2*, che pone il gene sotto il controllo dell'*enhancer* delle immunoglobuline;

- la presenza di mutazioni puntiformi, come la Phe232Cys, che rendono l'attività del recettore indipendente dal ligando.

Aumentati livelli di espressione di questo gene sono stati identificati nel 7% circa delle LAL B pediatriche in associazione a mutazioni dei geni *JAK1*, *JAK2* ed *IKZF1*. I pazienti che presentano queste alterazioni sono caratterizzati da un profilo genico *BCR/ABL1*-like con attivazione del *pathway JAK-STAT* e da una prognosi sfavorevole (Den Boer *et al*, Lancet Oncol 2009).

Mentre sono stati condotti numerosi studi su coorti pediatriche (Cario G. *et al*, Blood 2010, Hertzberg L. *et al*, Blood 2010; Ensor HM. *et al*, Blood 2011), al fine di determinare la frequenza ed il significato prognostico delle alterazioni di *CRLF2*, meno noto è il suo ruolo nelle LAL dell'adulto.

Lo scopo di questo studio è stato dunque quello di valutare l'espressione del gene *CRLF2* in una casistica di pazienti adulti affetti da LAL B con biologia molecolare negativa per i geni di fusione ricorrenti (*BCR/ABL1*; *ETV6/RUNX1*; *E2A/PXB1*; *ALL1/AF4*) ed identificare la presenza di una possibile correlazione tra i livelli di espressione del gene, le caratteristiche clinico-biologiche e la prognosi dei pazienti.

Inoltre, lo studio si è concentrato sulla ricerca di eventuali variazioni dell'espressione del gene nelle diverse fasce d'età considerate.

Infine, è stata valutata l'incidenza del trascritto *P2RY8/CRLF2* ed il suo impatto clinico nella stessa casistica.

## 3.2 Materiali e metodi

### 3.2.1 Caratteristiche dei pazienti

Per questo progetto è stata selezionata una casistica composta da 102 pazienti adulti affetti da LAL B, arruolati in differenti protocolli GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto). Tutti i campioni di sangue periferico o midollare sono stati collezionati alla diagnosi e presentavano un numero di blasti  $\geq 70\%$ .

L'età dei pazienti è variabile, da un minimo di 19 ad un massimo di 81 anni (età media 44 anni). In particolare, visto il nostro interesse nell'indagare l'eventuale presenza di una correlazione con l'età, i pazienti sono stati suddivisi in quattro fasce di età: 18-34 anni, 35-44 anni, 45-55 anni, >55 anni.

Tutti i casi studiati presentavano una biologia molecolare negativa per i geni di fusione ricorrenti nella LAL B. La Tabella 6 mostra la suddivisione dei pazienti in fasce d'età, con le relative caratteristiche dei singoli sottogruppi.

Fascia d'età	Numero casi	M/F	Età mediana
18-34	35	25/10	24.8
35-44	20	13/7	40.2
45-55	18	13/4	48.4
>55	29	16/14	68

**Tabella 6-** Suddivisione dei pazienti in fasce d'età e relative caratteristiche.

Le variabili cliniche considerate per l'analisi statistica includono: età, conta dei globuli bianchi (WBC), delle piastrine (PLTs) ed emoglobina alla diagnosi, risposta alla terapia di induzione, *disease-free survival* (DFS) ed *overall survival* (OS).

L'analisi statistica è stata condotta su un totale di 80 pazienti per i quali erano disponibili le suddette informazioni. In Tabella 7 sono riportate le caratteristiche cliniche della popolazione analizzata.

<b>Parametro</b>	<b>Valore minimo</b>	<b>Valore mediano</b>	<b>Valore massimo</b>
Età (anni)	16.8	43.6	81.9
Hb (g/dL)	4	8.8	15.8
WBC (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0.6	16.4	286
PLTs (x 10 <sup>3</sup> /μL)	5.4	44	376

**Tabella 7-** Caratteristiche clinico-biologiche della popolazione analizzata

### 3.2.2 Estrazione dell'RNA e reazioni di PCR

Dopo separazione delle cellule mononucleate da campioni di sangue intero mediante gradiente di densità, è stata eseguita l'estrazione dell'RNA totale. L'RNA è stato estratto utilizzando il TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY), seguito da precipitazione dell'acido nucleico con isopropanolo. Al termine dell'estrazione, la qualità del materiale è stata controllata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio; la concentrazione dell'RNA è stata calcolata misurando l'assorbanza a 260 nm e la sua purezza in base al rapporto dell'assorbanza 260/280.

Per valutare i livelli di espressione del gene sono state eseguite delle reazioni di PCR quantitativa attraverso l'utilizzo di primers specifici (5'-ATACCCAAGCGACTGGTCAGA-3'; 3'-GGGAGGCGTTGGTGTCTCT-5'). L'RNA precedentemente estratto è stato sottoposto a reazione di retrotrascrizione per ottenere cDNA, utilizzato poi nelle reazioni di Q-PCR. I livelli di espressione del gene *CRLF2* sono stati normalizzati per i livelli di espressione del gene costitutivo *GAPDH* ( $\Delta Ct = Ct \text{ CRLF2} - Ct \text{ GAPDH}$ ). Pertanto, a valori minori di  $\Delta Ct$  corrispondono elevati livelli di espressione del gene.

Le condizioni della Q-PCR utilizzate sono le seguenti: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti, 1 ciclo a 95°C per 10 minuti, 1 ciclo a 95°C per 15 secondi, 1 ciclo a 60°C per 1 minuto, per un totale di 40 cicli attraverso l'uso del lo strumento ABI PRISM 7300 Sequence Detection System e FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) Per l'identificazione del trascritto *P2RY8/CRLF2*, a partire dallo stesso cDNA, sono state eseguite delle reazioni di PCR qualitativa allestite utilizzando primers disegnati nel primo esone del gene *P2RY8* (5'-GGACAGATGGAAGG-3') e nel terzo esone del gene *CRLF2* (50-GTCCCATTCCTGATGGAGAA-30), dando così origine ad un frammento da 511bp. Le condizioni utilizzate per l'amplificazione sono le seguenti: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti; 40 cicli di denaturazione a 94°C per 30 s, annealing a 63°C per 30 s ed estensione a 72°C per 1 minuto; estensione finale 72°C per 10 minuti (Palmi C. *et al.* Leukemia 2012).

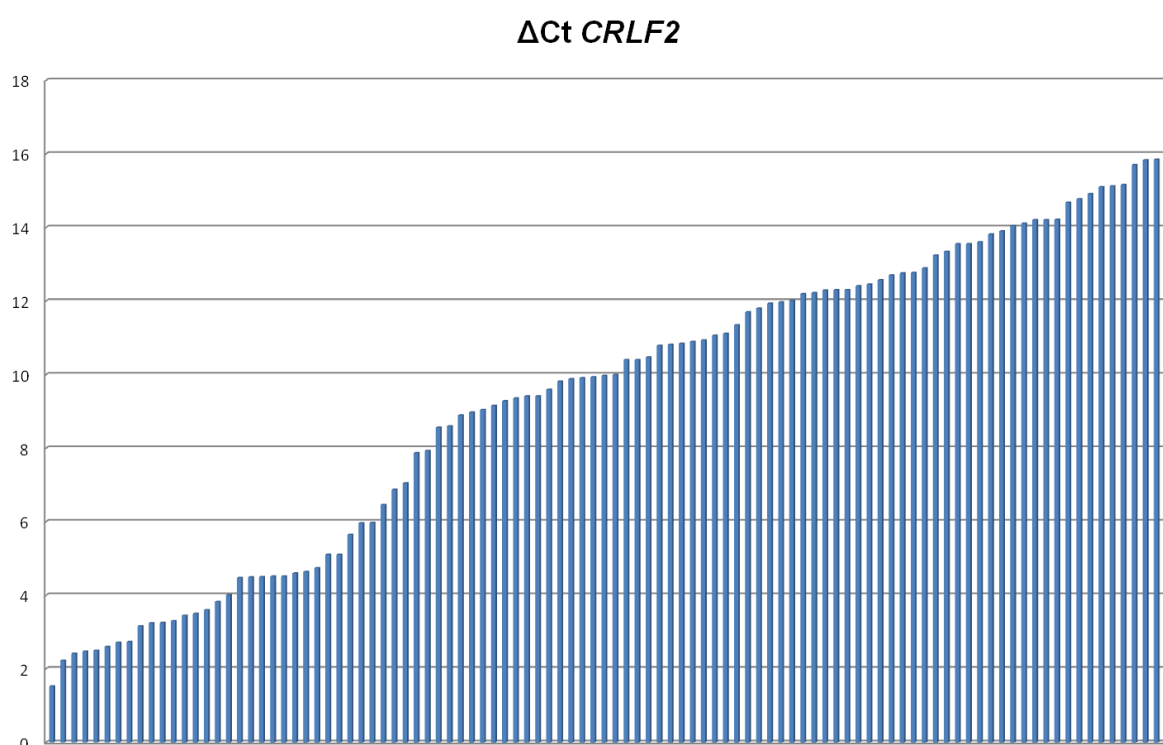


### 3.3 Risultati

#### 3.3.1 Espressione del gene *CRLF2*

I livelli di espressione del gene *CRLF2*, valutati attraverso Q-PCR, sono risultati molto eterogenei all'interno della casistica analizzata.

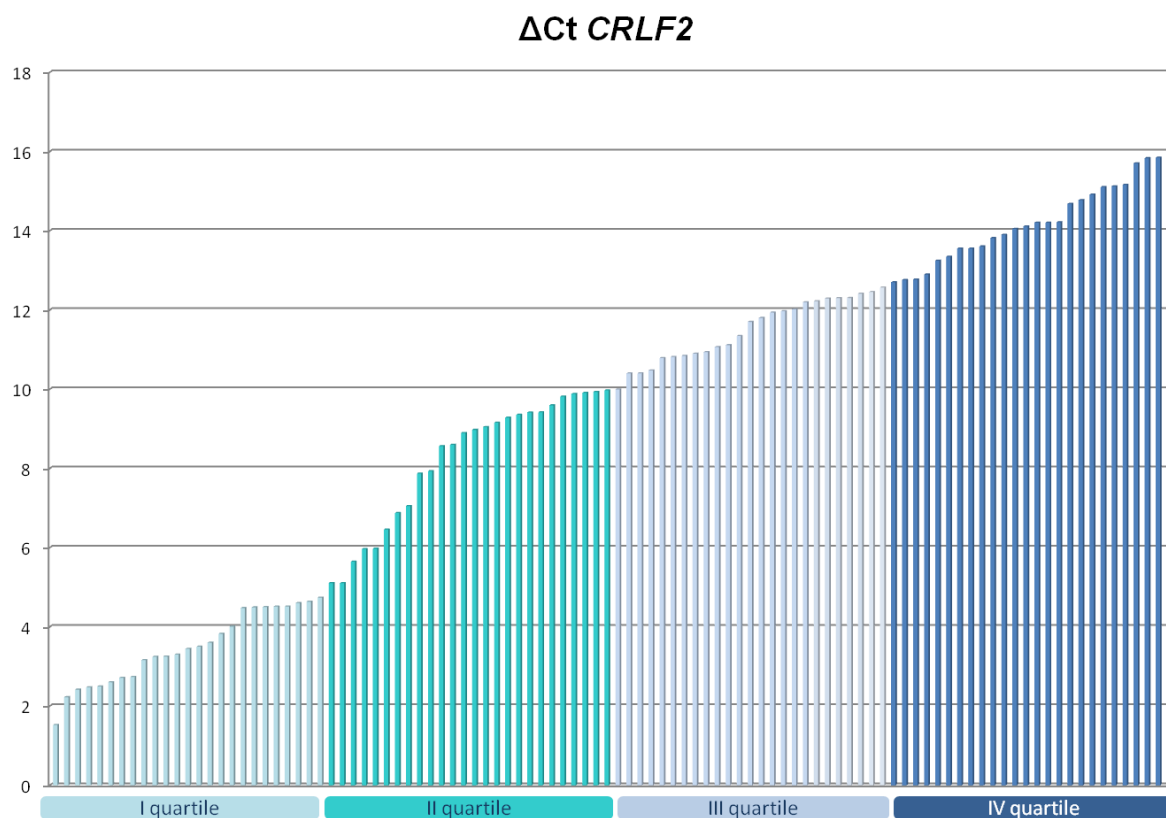
Tali valori, espressi in  $\Delta Ct$  e normalizzati sulla base dell'espressione del gene *housekeeping GADPH*, sono risultati compresi tra 1.5 e 17.3 (Figura 8).



**Figura 8-** Livelli di espressione ( $\Delta Ct$ ) del gene *CRLF2* nella casistica globale analizzata.

Sulla base di questi dati, al fine di definire dei gruppi differenziati per l'espressione di *CRLF2*, i 102 pazienti valutati sono stati suddivisi in quartili.

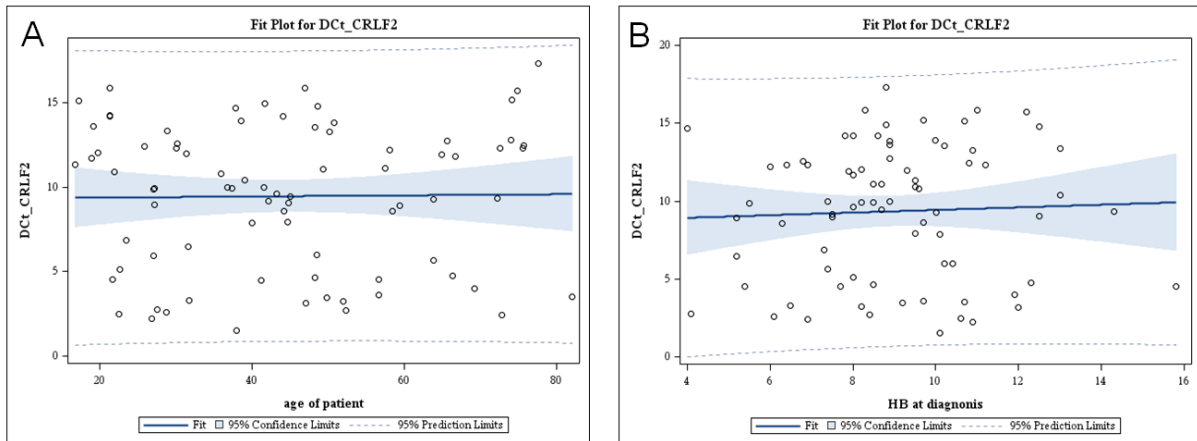
In questo modo i pazienti appartenenti al primo quartile presentano la maggiore espressione del gene ( $\Delta Ct$  1.52-4.73), mentre quelli che ricadono nel quarto quartile hanno i livelli di espressione più bassi ( $\Delta Ct$  12.75-17.3) (Figura 9), dato che il valore di  $\Delta Ct$  è inversamente proporzionale all'espressione.



**Figura 9-** Rappresentazione grafica che mostra la suddivisione in quartili della casistica analizzata, in base ai valori di  $\Delta Ct$  del gene *CRLF2*.

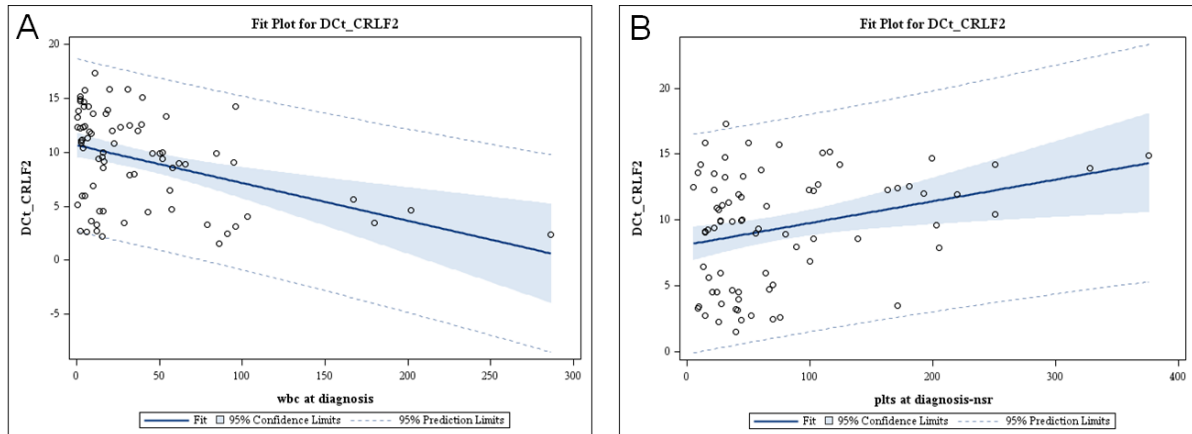
Successivamente, i livelli di espressione del gene sono stati correlati con le caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti analizzati.

L'analisi ha mostrato l'assenza di una correlazione statisticamente significativa tra i livelli di espressione di *CRLF2* e l'età ed i livelli di emoglobina dei pazienti alla diagnosi di malattia, con p-value pari a 0.9 e 0.7 rispettivamente (Figura 10).



**Figura 10**-Grafici che mostrano il confronto tra parametri clinico-biologici e livelli di espressione del gene *CRLF2* ( $\Delta Ct$ ). Nel pannello A è possibile notare l'assenza di correlazione tra età dei pazienti (anni) ed espressione del gene. Lo stesso si verifica per i livelli di Hb (g/dL) (pannello B).

Lo stesso tipo di confronto è stato eseguito per i valori di WBC e PLTs all'esordio di malattia. Per questi parametri è stata invece evidenziata la presenza di una correlazione statisticamente significativa tra iperespressione di *CRLF2* ed iperleucocitosi ( $p= 0.0002$ ) e piastrinopenia ( $p= 0.085$ ) alla diagnosi (Figura 11)



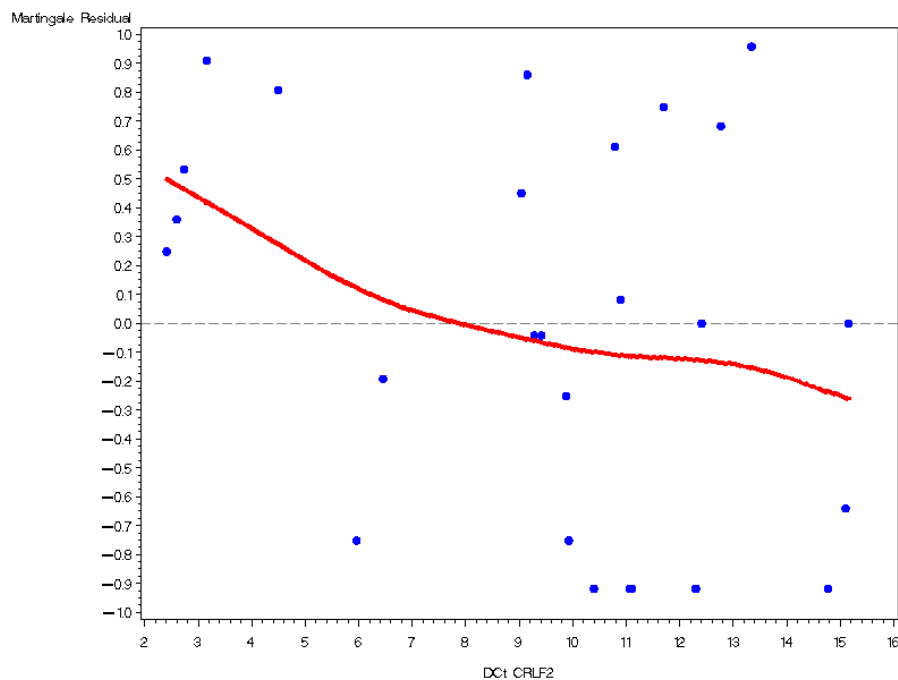
**Figura 11**- Grafici che mostrano il confronto tra parametri clinico-biologici e livelli di espressione del gene *CRLF2* ( $\Delta Ct$ ). Il pannello A mostra la presenza di una correlazione significativa tra elevati livelli di WBC ( $\times 10^3/\mu L$ ) ed aumentata espressione del gene. Nel pannello B la correlazione tra bassi livelli di PLTs ( $\times 10^3/\mu L$ ) ed iperespressione di *CRLF2*.

In seguito, l'elevata espressione di *CRLF2* è stata messa in correlazione con l'andamento clinico dei pazienti, al fine di individuare l'impatto che questo gene ha sulla popolazione studiata.

Per confrontare i due gruppi di pazienti e valutare se l'elevata espressione di *CRLF2* avesse un ruolo sull'andamento dei pazienti, si è resa necessaria l'individuazione di un cut-off dei valori di  $\Delta Ct$  di *CRLF2*, che consentisse di distinguere i pazienti overesprimenti dagli altri.

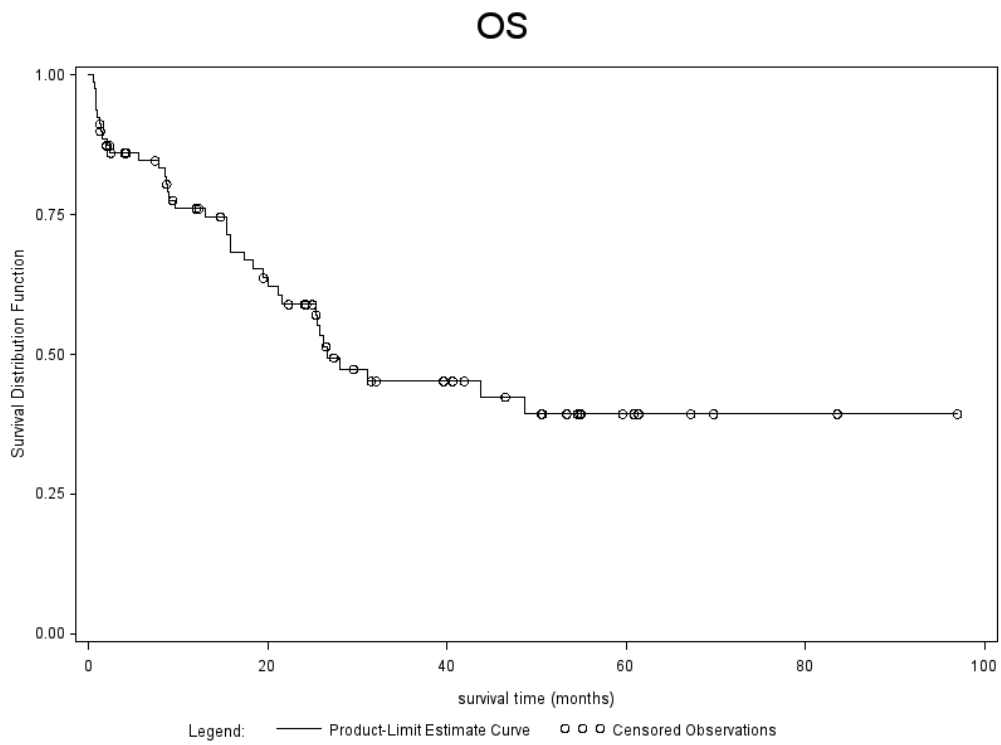
Attraverso un'analisi statistica basata su residui di martingala (Figura 12) questo cut-off è risultato essere pari ad 8.

Per valori di  $\Delta Ct \leq 8$ , *CRLF2* sembra assumere infatti un effetto sfavorevole, mentre per livelli di  $\Delta Ct \geq 8$  sembra avere un effetto protettivo sulla prognosi.

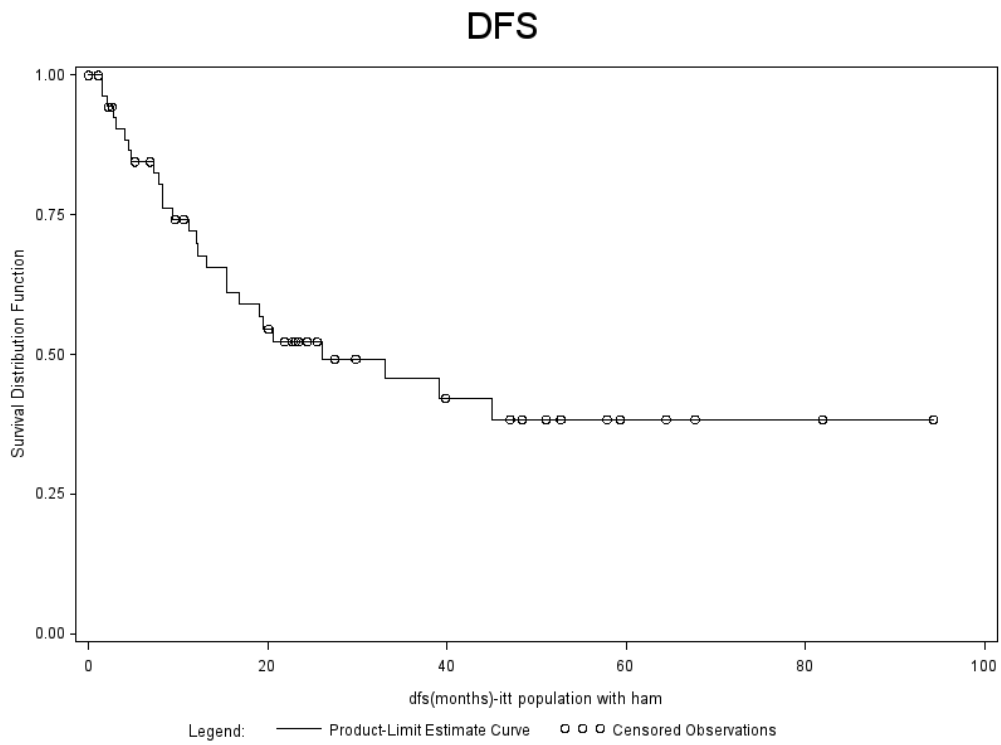


**Figura 12-** Grafico che mostra l'analisi di residui di martingala: da quest'analisi sembra possibile individuare un cut-point in prossimità del valore  $\Delta Ct=8$ .

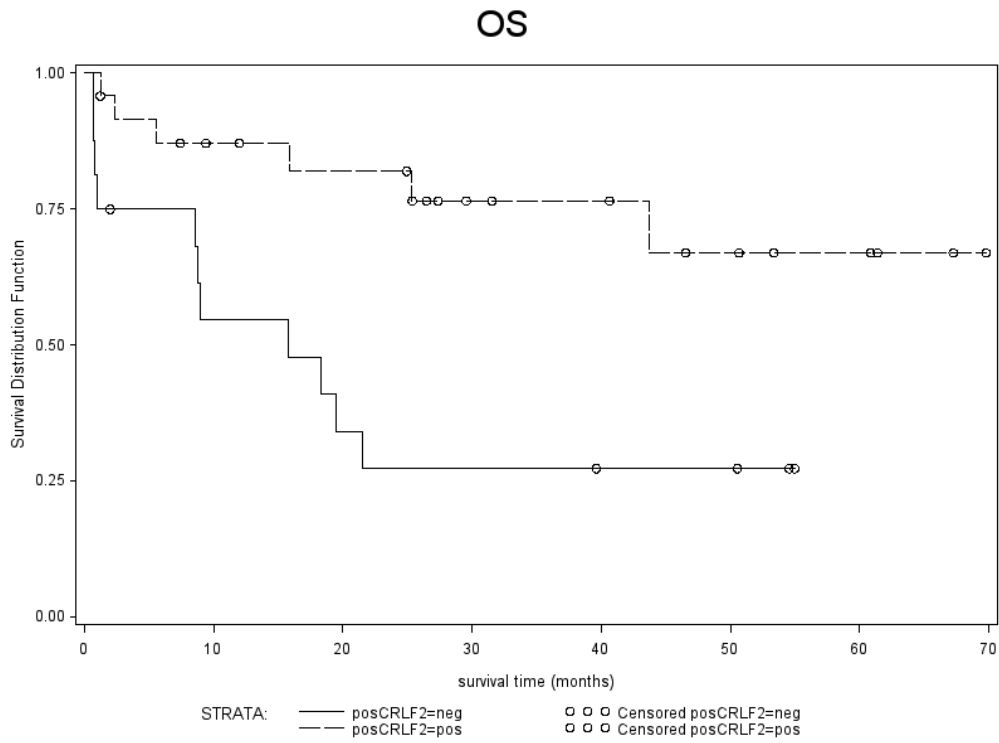
Il cut-off di 8 è stato ulteriormente validato utilizzando una *training* (n= 40) ed una *validation color* (n=40). La popolazione generale è stata cioè suddivisa in due coorti sovrapponibili per quanto riguarda le caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti inclusi. Successivamente, utilizzando il cut-off di  $\Delta Ct$  pari ad 8, sono stati calcolate curve di overall survival (OS) e disease-free survival (DFS). Entrambe le analisi mostrano un andamento nettamente peggiore dei pazienti overesprimenti il gene *CRLF2*, con p value pari a 0.0038 per l'overall survival e 0.0154 per la disease free survival. Le Figure 13 e 14 mostrano OS e DFS nella casistica generale, mentre le Figure 15 e 16 le stesse curve, stratificate in base all'espressione di *CRLF2*.



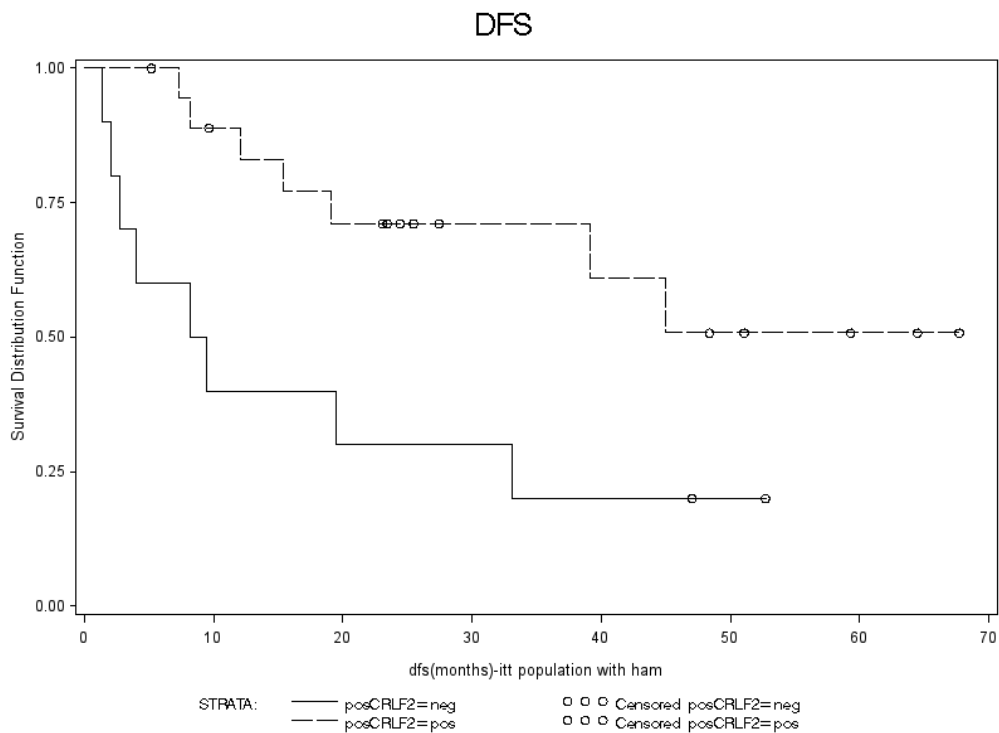
**Figura 13-** Curva di overall-survival (OS) della popolazione generale.



**Figura 14-** Curva di disease free survival (DFS) della popolazione generale.



**Figura 15-** Curve di overall survival (OS) nei due gruppi di pazienti: overesprimenti *CRLF2* (linea continua) e pazienti con bassa espressione del gene (linea tratteggiata). Si nota la ridotta sopravvivenza dei pazienti con elevata espressione di *CRLF2* ( $\Delta Ct \leq 8$ ).



**Figura 16-** Curve di disease free survival (DFS) dei due gruppi: overesprimenti *CRLF2* (linea continua) e pazienti con bassa espressione del gene (linea tratteggiata). Si nota il peggior andamento dei pazienti con elevata espressione di *CRLF2* ( $\Delta Ct \leq 8$ ), in termini di ridotta sopravvivenza libera da malattia.

### **3.3.2 Identificazione del trascritto *P2RY8/CRLF2***

Per quanto riguarda l'identificazione del trascritto *P2RY8/CRLF2*, la sua presenza è stata riscontrata mediante PCR qualitativa, in 8/102 (7.8%) pazienti valutati.

Nella metà dei casi la presenza del trascritto si associa ad elevati livelli di espressione del gene, mentre negli altri l'espressione del gene risulta variabile. Questo dato è in accordo con quanto riportato in letteratura in studi condotti su casistiche pediatriche (Palmi et al).

Recentemente è stata riportata l'associazione tra la positività per questo riarrangiamento e l'aumentata incidenza di recidive di malattia (Palmi C. et al, Leukemia 2012; Ensor HM. et al, Blood 2011).

Per valutare la presenza di questa correlazione anche nella nostra casistica, si è cercato di condurre un'analisi sulla base dei dati di *outcome*.

Purtroppo i dati riguardanti l'andamento clinico ed il follow-up erano disponibili solamente nella metà dei casi risultati positivi, quindi non è stato possibile eseguire una valutazione statistica.

Tuttavia, degli 8 pazienti risultati positivi per *P2RY8/CRLF2*, due sono andati incontro a recidiva di malattia, rispettivamente a 3 ed a 6 mesi dall'ottenimento della remissione completa, e due sono invece deceduti durante la chemioterapia di induzione.

### 3.4 Discussione

Negli ultimi anni numerosi studi si sono concentrati sulla valutazione dei pazienti affetti da LAL B che non presentano riarrangiamenti molecolari noti, al fine di individuare uno o più marcatori da poter utilizzare per la stratificazione prognostica di questo gruppo di pazienti, a tutt'oggi poco caratterizzato. Uno dei geni emerso recentemente come un possibile candidato è *CRLF2*.

Questo gene è stato ampiamente indagato in numerose casistiche pediatriche, ma il suo ruolo prognostico resta tuttora poco chiaro. In letteratura, sono riportati infatti dati discordanti sull'impatto clinico rivestito dagli elevati livelli di espressione del gene associati o meno alla presenza di mutazioni o trascritti. Uno studio condotto dal *Children Oncology Group* (COG) ha mostrato un'elevata frequenza di alterazioni di *CRLF2* (soprattutto *IGH@CRLF2*) nei pazienti affetti da LAL B classificati ad alto rischio e di etnia ispanica (14%). In questi casi è stata dimostrata un'associazione tra la presenza delle alterazioni ed un peggior andamento clinico dei pazienti (Harvey RC. *et al*, Blood 2010). Un altro studio del COG (Chen IM. *et al*, Blood 2012) ha mostrato invece che solamente l'overespressione del gene, ma non la presenza di trascritti, è associata ad una prognosi infausta.

I riarrangiamenti coinvolgenti *CRLF2* si sono dimostrati non correlati alla prognosi in studi eseguiti dal *Medical Research Council* (MRC) inglese su coorti pediatriche: in particolare Ensor *et al*. hanno mostrato che i casi riarrangiati risultavano avere un andamento clinico paragonabile a quello dei pazienti a rischio intermedio (Ensor HM. *et al*, Blood 2011). Al contrario, altri gruppi europei come il Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) e l'Associazione Italiana di Oncologia ed Ematologia Pediatrica (AIEOP), hanno evidenziato un aumentato rischio di recidive nei pazienti pediatrici positivi per il trascritto *P2RY8/CRLF2* (Cario G. *et al*, Blood 2010; Palmi C. *et al*, Leukemia 2012; Attarbaschi A. *et al*, Br J Haematol. 2012).

Questi risultati discordanti sono probabilmente attribuibili alle differenze nei criteri di selezione delle casistiche analizzate (età, classe di rischio, etc) ed alle diverse metodiche utilizzate per l'identificazione dei trascritti e la valutazione dell'espressione del gene (Q-PCR, MLPA, FISH, etc.).

Gli studi condotti su casistiche composte da pazienti adulti sono rari: un lavoro di Moorman *et al*. ha riportato l'associazione tra la deregolazione di *CRLF2*, intesa come la positività ai trascritti *P2RY8/CRLF2* o *IGH@CRLF2* rilevata con metodica MLPA o FISH, ed un andamento



clinico sfavorevole in pazienti adolescenti e adulti affetti da LAL B (Moorman AV. *et al*, J Clin Oncol. 2012).

In questo panorama molto vario, il nostro studio si è concentrato sulla valutazione dei livelli di espressione di *CRLF2* in una casistica di 102 pazienti adulti affetti da LAL, ponendo un'attenzione particolare alle fasce di età analizzate (adolescenti, giovani adulti, adulti ed anziani).

Questo lavoro ha dimostrato che l'espressione del gene è estremamente eterogenea nell'ambito delle LAL B dell'adulto prive di traslocazioni ricorrenti.

Non è stato possibile evidenziare alcuna associazione significativa con le diverse fasce d'età e ciò suggerisce quindi la probabile presenza di altri meccanismi molecolari alla base del peggior andamento clinico dei pazienti adulti rispetto ai bambini affetti da questa patologia. È stata invece dimostrata la presenza di una correlazione statisticamente significativa tra elevati livelli di espressione del gene, l'iperleucocitosi e la piastrinopenia alla diagnosi.

Inoltre, è stato possibile identificare un valore di cut-off del  $\Delta Ct$  di *CRLF2*, potenzialmente utile per una possibile stratificazione dei pazienti affetti da LAL alla diagnosi.

Il valore di  $\Delta Ct=8$  è stato recentemente riportato anche in uno studio eseguito da Chen *et al*. su una casistica di pazienti pediatriche, dove, utilizzando tale cut-off, il 17.5% dei pazienti risultava esprimere elevati livelli del gene (Chen IM. *et al*, Blood 2012).

Basandoci su questo valore soglia, nel nostro studio 35/102 (34.3%) pazienti sono risultati overespressanti *CRLF2*, percentuale maggiore di quanto dunque evidenziato nei bambini, ed in linea con la peggiore prognosi dell'adulto.

Analizzando i dati di *outcome* ed utilizzando il suddetto cut-off, è stato possibile dimostrare la presenza di una correlazione significativa tra l'aumentata espressione del gene ed un riduzione di OS e DFS, mentre non è emersa nessuna associazione con la risposta alla terapia di induzione.

Questi dati supportano dunque l'evidenza di un potenziale ruolo di *CRLF2* quale marcatore prognostico da utilizzare per la stratificazione dei pazienti affetti da LAL B senza altre aberrazioni note, non altrimenti classificabili.

Questo gene individua inoltre un gruppo di pazienti nei quali l'utilizzo di farmaci inibitori di *JAK1* e *JAK2* potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica mirata (Roberts KG. *et al*, Cancer Cell 2012).

A supporto di ciò, la valutazione del GEP eseguita su alcuni dei pazienti studiati, ha mostrato che i casi con elevata espressione di *CRLF2* presentavano un profilo trascrizionale sovrapponibile a quello dei pazienti definiti *BCR/ABL1*-like. Questa categoria è nota per essere caratterizzata dalla presenza di mutazioni aggiuntive nei geni *JAK2*, *IKZF1* e da una prognosi sfavorevole. Un'analisi condotta con tecnologia di NGS (piattaforma Roche GS Junior 454) su una parte dei pazienti, ha infatti evidenziato la presenza di mutazioni puntiformi a carico dell'esone 6 del gene *CRLF2* nel sito *hotspot* (F232C) e dell'esone 16 del gene *JAK2* (R683S) in tre casi, che presentavano contestualmente elevati livelli di espressione del gene.

Infine, il nostro studio ha mostrato un'incidenza del trascritto *P2RY8/CRLF2* paragonabile a quanto già riportato nelle casistiche pediatriche (7%). Si è confermato che la positività per il trascritto non correla con la presenza di elevati livelli di espressione del gene nella totalità dei casi. Questo dato, riportato in precedenza da Palmi *et al.*, ci porta a speculare sulla possibile presenza dell'aberrazione solamente in cloni minoritari di blasti leucemici.

In conclusione, questo studio ha mostrato che la valutazione dei livelli di espressione di *CRLF2* nella LAL dell'adulto, è utile in un algoritmo di stratificazione prognostica alla diagnosi. Studi prospettici sono tuttavia necessari per confermare la validità e l'applicabilità di questi risultati.

Sono attualmente in corso ulteriori analisi per definire se la valutazione immunofenotipica dei livelli proteici di *CRLF2* possa essere utilizzabile nella stratificazione prognostica dei pazienti con leucemia acuta linfoide.

Infine, l'integrazione di studi di *next-generation sequencing* nei pazienti affetti da LAL negativi per i geni di fusione ricorrenti potrebbe consentire di comprendere se, oltre ai meccanismi sopramenzionati (vd paragrafo 3.1), esistano altri eventi patogenetici sottostanti l'iperespressione di *CRLF2*; questo al fine di migliorare la caratterizzazione biologico-molecolare di questo gruppo di pazienti molto eterogeneo e difficilmente classificabile con gli attuali criteri utilizzati per la stratificazione prognostica.

## Capitolo 4

### Progetto 2- Valutazione delle mutazioni del gene *TP53* nella LAL B dell'adulto nell'ambito del progetto IRON II

#### 4.1 Background

##### 4.1.1 Il gene *TP53*

Il gene *TP53* è un oncosoppressore localizzato al livello del braccio corto del cromosoma 17, in posizione 17p13.1. La proteina codificata è una fosfoproteina di 393 aminoacidi, dal peso di 53kDa. Essa presenta tre domini funzionali: il dominio N-terminale, il dominio centrale e il dominio C-terminale.

Il dominio N-terminale, denominato dominio di trascrizione-attivazione (TAD), contiene le sequenze necessarie per l'attivazione trascrizionale della proteina ed il sito di legame della proteina regolatoria mdm2, il principale inibitore di p53.

Il dominio centrale, detto dominio legante il DNA (*DNA binding-core domain* o DBD), permette il legame della proteina con il DNA dei geni target, e risulta essere sede di mutazioni nel 90% dei casi di neoplasie umane.

Il dominio C-terminale, o dominio di omo-oligomerizzazione (OD), contiene invece le sequenze necessarie per la tetramerizzazione della proteina, processo che ne aumenta fortemente l'attività in vivo. Il dominio OD contiene anche un sito di localizzazione nucleare (NLS), una sequenza segnale per l'esportazione dal nucleo (NES- *nuclear export signal*) ed un dominio non specifico per il legame con il DNA danneggiato.

Le principali funzioni di p53 comprendono la regolazione del ciclo cellulare e la morte cellulare programmata in risposta agli stress di origine esogena. L'attivazione di p53 dà infatti inizio ad un programma di trascrizione genica che riflette la natura del segnale di stress. Essa induce l'espressione dei geni a valle, che attivano a loro volta diverse vie di segnale, determinando l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione del DNA oppure l'apoptosi cellulare. La via principale che porta all'interruzione del ciclo cellulare è mediata dall'attivazione della proteina p21: p53 promuove la trascrizione del gene che codifica per p21, il quale lega complessi proteici che svolgono un ruolo di controllo del ciclo cellulare (G1/S-Cdk e S-Cdk), inattivandoli e inducendo così l'arresto del ciclo cellulare.

La proteina p53 è inoltre coinvolta in diversi processi di riparazione del DNA: la riparazione per escissione di nucleotidi (NER), per escissione di una base (BER), per ricombinazione omologa e non omologa.

In particolare, la proteina attiva GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage Inducible*) che svolge la funzione di proteina riparatrice, impedendo l'ingresso della cellula danneggiata nella fase S del ciclo cellulare. Durante questo periodo di arresto hanno luogo i principali meccanismi di riparazione del materiale genetico.

La capacità di p53 di indurre l'apoptosi è sostenuta invece da due distinti meccanismi: da una parte la proteina determina la produzione di proteine pro-apoptotiche che scatenano il processo di morte cellulare programmata agendo sul mitocondrio, dall'altra essa è in grado di raggiungere lo stesso risultato attraverso la produzione o l'attivazione di specifici recettori di superficie cellulari (tra tutti il più importante è il recettore Fas).

Le alterazioni a carico del gene *TP53* sono notoriamente coinvolte nel processo di tumorigenesi e numerosi gli studi hanno dimostrato il loro ruolo nell'insorgenza di diversi tumori solidi, come il melanoma, l'epatocarcinoma ed il tumore della mammella (Barckhausen C. *et al*, *Oncogene* 2013; Knudsen E.S. *et al*, *Am J Pathol.* 2014; Arjonen A. *et al*, *J Clin Invest.* 2014).

Nell'ambito delle patologie oncoematologiche, le alterazioni di questo gene sono state ampiamente descritte sia nella leucemia acuta mieloide (LAM) che nella leucemia linfatica cronica (LLC). Nella LAM, mutazioni di *TP53* sono state descritte nel 7% circa dei casi, ma la loro incidenza aumenta nettamente nei pazienti con cariotipo complesso (Haferlach C. *et al*, *Leukemia* 2008; Volkert S. *et al*, *Genes Chromosomes Cancer* 2014).

Nella LLC invece, le alterazioni di *TP53* variano in accordo con lo stadio della malattia, con un'incidenza che va dal 3% nei pazienti alla diagnosi al 40% nei casi refrattari al trattamento (Rossi D. *et al*, *Clin Cancer Res* 2009).

Nell'ambito della LLC inoltre, l'utilizzo di tecnologie di NGS ha evidenziato la presenza di mutazioni subclonali (<20% delle cellule) di *TP53* nel 9% dei casi alla diagnosi: queste alterazioni conferiscono una prognosi sfavorevole, al pari di quelle presenti al livello clonale (Rossi D. *et al*, *Blood* 2014).

Le mutazioni di *TP53* sono state infatti associate a resistenza alla chemioterapia, e sembrano rappresentare uno dei più importanti predittori di ridotta sopravvivenza, sia nella LAM che

nella LLC ed in numerose altre patologie tumorali (Aas T. *et al*, Nat Med 1996; Cordone I. *et al*, Blood 1998; Peller S. *et al*, Hum Mutat. 2003; Poeta ML. *et al*, N Engl J Med. 2007; Zenz T. *et al*, J Clin Oncol. 2010,).

Nella LAL, invece, le alterazioni di *TP53* sono state indagate in misura molto minore, e la maggior parte degli studi sono stati condotti su casistiche pediatriche. In un lavoro recente condotto su pazienti in prima recidiva di malattia, Hof *et al.* hanno dimostrato che mutazioni e/o delezioni a carico di questo gene sono identificabili nel 6.4% ed 11% dei casi di LAL B e LAL T pediatriche, rispettivamente (Hof J. *et al*, J Clin Oncol 2011). Risultati simili sono stati ottenuti anche in uno studio seguente di Krentz *et al.*, nel quale la presenza di mutazioni era associata ad un andamento clinico sfavorevole solamente nel gruppo di pazienti a rischio intermedio, mentre non sembra avere significato prognostico nei casi classificati ad alto rischio (Krentz S. *et al*, Leukemia 2013).

Visti questi risultati e la scarsità di dati disponibili in letteratura, il nostro gruppo si è concentrato sulla valutazione delle mutazioni del gene *TP53* nella LAL dell'adulto, conducendo due progetti basati su metodiche distinte. Il primo lavoro, pubblicato nel 2013, si è avvalso di una tecnologia basata su *array*; il secondo ha sfruttato invece una metodica di *next generation sequencing*.

#### 4.1.2 Studio Amplichip p53

Lo scopo di questo progetto (Chiaretti S. *et al*, Haematologica 2013) è stato quello di valutare l'incidenza ed il significato prognostico delle mutazioni del gene *TP53* in una casistica di pazienti adulti affetti da LAL, attraverso l'utilizzo della metodica *Amplichip p53 Research Prototype Test* (Roche Molecular Systems). La tecnica si basa sull'utilizzo di *array*, sulla cui superficie sono immobilizzate delle sonde in grado di riconoscere e legare sequenze complementari del DNA testato. Questo chip è esclusivamente mirato all'analisi di *TP53*, e consente la contemporanea valutazione degli esoni dal 2 al 11, compresi i siti di *splicing*.

L'*array* permette di individuare sia mutazioni puntiformi che delezioni di singole basi (Chiaretti S. *et al*, Genes Chromosomes Cancer. 2011).

Per questo progetto sono stati valutati 98 pazienti adulti affetti da LAL: i campioni di sangue periferico o midollare sono stati collezionati alla diagnosi di malattia e contenevano una percentuale di blasti  $\geq 70\%$ . In 10 casi è stato possibile analizzare anche il corrispettivo materiale della recidiva.

La casistica si componeva di 62 casi di LAL a fenotipo B e 36 a fenotipo T. Nell'ambito delle LAL B, 25 pazienti risultavano positivi per il trascritto *BCR/ABL1*, 9 per *MLL/AF4*, 4 per *E2A/PBX1*; per ciò che riguarda le LAL T invece, 7 casi erano positivi per il trascritto *SIL/TAL1*, uno per *NUP214/RAP* ed uno per *SET/NUP214*. Nei restanti 51 casi, la valutazione della biologia molecolare è risultata negativa per i geni di fusione ricorrenti (24 LAL B e 27 LAL T).

L'analisi condotta con *Amplichip p53* ha consentito l'identificazione di mutazioni di *TP53* nell'8.2% dei casi valutati alla diagnosi (8/98), in maniera paragonabile a quanto riportato in letteratura sia nella LAM che nei casi di LLC in progressione di malattia (Fenaux P. *et al*, Br J Haematol. 1992; Zenz T. *et al*, J Clin Oncol. 2010).

Per quanto riguarda l'immunofenotipo, degli 8 casi mutati 4 erano LAL B (6.4%) e 4 LAL T (11.1%). L'incidenza delle mutazioni nei pazienti adulti è risultata lievemente maggiore di quanto riportato in letteratura nei casi pediatrici, sia per quanto riguarda le LAL B che le LAL T: infatti nella nostra casistica il 6.4% (4/62) dei casi a fenotipo B presentava alterazioni del gene, rispetto al 2% riportato nei bambini (Wada M. *et al*, Blood. 1993).

In particolare, dei 4 casi LAL B mutati, uno risultava positivo per *BCR/ABL1* (4%), mentre i restanti presentavano una biologia molecolare negativa (12.5%).

Anche nell'ambito dei casi LAL T alla diagnosi, l'incidenza delle mutazioni di *TP53* rilevate nella nostra casistica era maggiore di quanto riportato per i casi pediatrici, con un'incidenza dell'11.1% (4/36) negli adulti rispetto al 5% nei pediatrici (Kawamura M. *et al*, Leuk Res. 1999).

Per quanto riguarda l'analisi molecolare invece, tutti i casi LAL T risultati mutati si presentavano negativi per i trascritti di fusione ricorrenti (Tabella 8).

	<b>TP53 mutati (n=8)</b>	<b>TP53 wild-type (n=90)</b>
<b>Età alla diagnosi (mediana)</b>	30.12	36.42
<b>Genere: M/F</b>	6/4	54/36
<b>WBC x10<sup>3</sup>/uL (mediana)</b>	52.03	57.05
<b>PLTs x10<sup>3</sup>/uL (mediana)</b>	52.5	45
<b>Immunofenotipo</b>		
LAL B (n=62)	4 (6.4%)	58 (93.6%)
LAL T (n=36)	4 (11.1%)	32 (88.9%)
<b>Alterazioni molecolari LAL B</b>		
<i>BCR/ABL1</i> (n=25)	1 (4%)	24 (96%)
<i>MLL/AF4</i> (n=9)	0 (0%)	9 (100%)
<i>E2A/PBX1</i> (n=4)	0 (0%)	4 (100%)
Molecolarmente negativi (n=24)*	3 (12.5%)	21 (87.5%)

**Tabella 8-** Distribuzione delle mutazioni di *TP53* nella casistica analizzata, con le rispettive caratteristiche clinico-biologiche.  
\* Casi risultati negativi per i trascritti di fusione ricorrenti (i.e. *BCR/ABL1*, *MLL/AF4*, *E2A/PBX1*, *ETV6/RUNX1*).

Complessivamente, le mutazioni del gene sono quindi risultate più frequenti nel gruppo di pazienti con biologia molecolare negativa per riarrangiamenti noti (13.7%), rispetto agli altri sottogruppi molecolari.

Tutte le mutazioni identificate nei casi esaminati alla diagnosi coinvolgevano gli esoni 7 e 8 del gene, già riconosciuti come *hot-spot*, e sono state successivamente confermate mediante sequenziamento Sanger. In un unico caso la mutazione non si è confermata, suggerendo la probabile presenza di un subclone, troppo esiguo per essere identificato attraverso questa metodica.

In 10 casi l'analisi mutazionale è stata condotta su materiale *paired*, costituito da campioni sia della diagnosi che della recidiva di malattia, rappresentata in 7 casi da LAL B ed in 3 da LAL T.

Mentre tutti i campioni alla diagnosi sono risultati negativi, in 2 casi (uno LAL B *BCR/ABL1+* ed uno LAL T) la mutazione è stata acquisita nel campione della recidiva.

Riassumendo quindi, attraverso l'utilizzo della metodica *Amplichip p53* nella nostra coorte di pazienti adulti sono state rilevate 10 mutazioni a carico del gene *TP53*, 8 identificate nei casi studiati alla diagnosi e 2 nelle recidive.

Questi risultati confermano quanto già riportato (Tang JL *et al*, *Anticancer Res.* 1998; Zhu YM *et al*, *Br J Cancer* 1999), ossia che le mutazioni di *TP53* aumentano alla recidiva di malattia, anche se l'incidenza riportata nel nostro studio risulta inferiore rispetto a quanto sostenuto recentemente su una casistica pediatrica. Questa discrepanza è probabilmente dovuta al criterio di selezione utilizzato da Hof *et al*: i campioni inclusi in questo lavoro infatti, sono stati selezionati dapprima alla recidiva e dei casi risultati mutati è poi stato analizzato il campione della diagnosi (Hof J. *et al*, *J Clin Oncol.* 2011). Nel nostro caso invece, è stato eseguito uno screening di pazienti all'esordio di malattia, e laddove disponibile, il materiale della recidiva è stato valutato, indipendentemente dalla presenza di mutazioni alla diagnosi.

Successivamente, si è voluto indagare l'eventuale esistenza di una correlazione tra la presenza di mutazioni e l'andamento clinico. Degli 8 pazienti mutati alla diagnosi, 4 (50%) non hanno ottenuto la remissione completa. Dato che la maggior parte delle mutazioni sono state rilevate nei casi negativi per i geni di fusione ricorrenti (7/8), l'analisi si è concentrata esclusivamente su questo sottogruppo pazienti. I dati di *outcome* erano disponibili per 43 pazienti: di questi 30 hanno ottenuto la RC, 6 sono risultati refrattari alla terapia e 7 sono deceduti durante la terapia di induzione. Andando a correlare la risposta al trattamento, dei 6 casi refrattari alla terapia di induzione 3 (50%) presentavano mutazioni a carico di *TP53*. Questo suggerisce un impatto negativo sostenuto dalle alterazioni di questo gene sulla risposta alla terapia ( $p=0.059$ ).

In conclusione, questo studio ha dimostrato che le mutazioni di *TP53* sono relativamente frequenti nei pazienti adulti affetti da LAL B sia B che T, e che lo screening specifico di questo gene potrebbe risultare particolarmente utile nella stratificazione prognostica di questi pazienti.



Si è identificata una maggiore frequenza di tali mutazioni nel sottogruppo delle LAL a fenotipo T e nei pazienti negativi per trascritti di fusione ricorrenti, indipendentemente dal fenotipo.

È stata inoltre evidenziata una correlazione tra la presenza di queste alterazioni ed una mancata risposta alla terapia di induzione. Questo suggerisce l'utilità della valutazione dello stato mutazionale di *TP53* nei pazienti adulti affetti da LAL alla diagnosi, in particolare nei casi negativi per i trascritti di fusione ricorrenti. Ciò risulta di grande importanza in questo gruppo di pazienti, per i quali la ricerca di un marcatore prognostico appare sempre più indispensabile al fine dello sviluppo di una terapia mirata.

## 4.2 Il progetto IRON II

Il progetto IRON (*Interlaboratory RObustness of Next-generation sequencing*) è uno studio internazionale, che ha come centro coordinatore l'MLL (*Münchner Leukämie Labor*) di Monaco, ed è volto ad analizzare, mediante l'utilizzo della metodica di NGS GS Junior Roche 454, l'impatto prognostico di alcune mutazioni precedentemente descritte in oncoematologia.

Nel primo studio condotto, il progetto IRON I, si è voluta determinare la robustezza, la precisione e la riproducibilità dei dati originati dall'uso della tecnica Roche 454 in 10 diversi laboratori di 8 nazioni. Questo studio si è concentrato in particolare sulla valutazione delle mutazioni dei geni *TET2*, *CBL* e *KRAS* in 18 pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (LMC). I risultati hanno mostrato una elevata concordanza tra i diversi centri, sia nella rilevazione delle mutazioni note, evidenziate da precedenti studi di Sanger, che nell'individuazione di varianti nuove, non rilevate precedentemente perché presenti in una piccola quota di cellule (Kohlmann A. *et al*, *Leukemia* 2011). La sensibilità dello strumento si attesta attorno al 1-2%, rispetto al 20% raggiunto dal sequenziamento con metodo Sanger.

Visti questi risultati, si è deciso di proseguire con la seconda parte del progetto, detto IRON II. In una prima fase, sono state selezionate mutazioni rilevanti nelle diverse patologie oncoematologiche, e sono stati disegnati dei primers per l'identificazione delle stesse. I centri partecipanti si sono suddivisi in subteams, a seconda della patologia in esame. Successivamente, con il supporto di Roche Diagnostics, sono state disegnate delle piastre specifiche, atte ad analizzare più geni e/o pazienti contemporaneamente, in uno stesso esperimento.

In questo contesto, il nostro gruppo si è concentrato sull'analisi del gene *TP53* nella LAL, valutato in una casistica di pazienti provenienti da 10 centri internazionali: tale analisi aveva lo scopo di definire l'incidenza delle mutazioni di *TP53* sia alla diagnosi che alla recidiva di malattia, in casistiche di pazienti adulti e pediatrici. Inoltre, si è voluta indagare l'esistenza di una eventuale correlazione tra la presenza di mutazioni del gene ed un particolare sottotipo immunofenotipico o molecolare. Infine, si è cercato di definire il significato prognostico delle mutazioni di *TP53*.

I risultati qui riportati si riferiscono alla prima fase del progetto IRON II, recentemente conclusasi.

## 4.2.1 Materiali e metodi

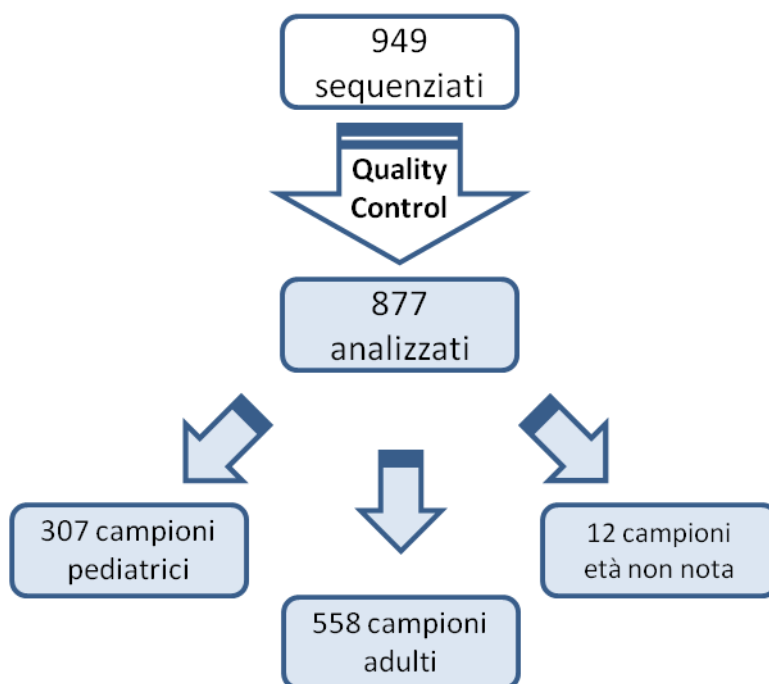
### Casistica analizzata

Per il progetto IRON II sono stati collezionati un totale di 949 campioni di pazienti affetti da LAL, sia a fenotipo B che T, provenienti da 10 laboratori di sei diversi Paesi. I centri sono stati organizzati in modo da riuscire ad arruolare un numero di pazienti consistente sia per quanto riguarda la casistica dei pazienti pediatrici che quella degli adulti (Tabella 9).

Centri (n= 10)	Italia (n=4)	Germania (n=2)	Spagna (n=1)	Belgio (n=1)	Turchia (n=1)	Singapore (n=1)
<b>Casi pediatrici</b>	Padova	-	Salamanca	-	Istanbul	Singapore
<b>Casi Adulti</b>	Bergamo Bologna Roma	Monaco Kiel	-	Lovanio	-	-

**Tabella 9-** Schema riassuntivo dei centri partecipanti al progetto IRON II- fase I, suddivisi in base alla nazionalità ed alla tipologia della casistica analizzata (pazienti pediatrici o adulti).

Gli esperimenti sono stati eseguiti dai singoli laboratori individualmente, mentre i dati ottenuti sono stati analizzati in maniera centralizzata. Applicando un controllo di qualità (vedi oltre), 877 campioni sono risultati idonei per l'analisi, di cui 307 casi pediatrici e 558 adulti. Per 12 campioni non si disponeva del dato dell'età (Figura 17).



**Figura 17-** Flow-chart rappresentante il percorso di selezione dei pazienti inclusi nello studio IRON II.

La casistica pediatrica si componeva di 263 LAL B e 44 LAL T: nell'ambito delle LAL a fenotipo B la valutazione molecolare ha evidenziato 16 casi *BCR/ABL1+*, 13 *E2A/PBX1+*, 43 *ETV6/RUNX1+*, 13 casi presentavano riarrangiamenti coinvolgenti il gene *MLL*, mentre 175 casi sono risultati negativi per le suddette alterazioni. I casi adulti invece, comprendevano 441 LAL B e 117 LAL T. In 126 casi è stata dimostrata la positività per il trascritto *BCR/ABL1*, in 9 per *E2A/PBX1*, in 43 casi sono stati evidenziati riarrangiamenti del gene *MLL*, mentre 244 casi sono risultati negativi per i geni di fusione ricorrenti. In 22 casi totali il dato di biologia molecolare non era disponibile. La Tabella 10 riassume le caratteristiche della casistica analizzata.

	Casi Pediatrici (n=307)	Casi adulti (n=558)
<b>Età alla diagnosi (valore mediano)</b>	14.5	47
<b>Immunofenotipo</b>		
LAL B (n= 716)*	263	441
LAL T (n=161)	44	117
<b>Alterazioni molecolari nelle LAL B</b>		
Riarrangiamenti <i>MLL</i> (n=57)*	13	43
<i>BCR/ABL</i> (n=146)*	16	126
<i>E2A/PBX1</i> (n=22)	13	9
<i>ETV6/RUNX1</i> (n=43)	43	0
Negativi per geni di fusione ricorrenti (n=426)*	175	244
Dato molecolare mancante (n=22)	3	19

**Tabella 10-** Caratteristiche clinico-biologiche della popolazione analizzata, suddivisa in casistica pediatrica ed adulta. \* I 12 casi di cui non si disponeva del dato dell'età risultavano *BCR/ABL1+* (4 casi), riarrangiati per *MLL* (1 caso) e negativi per i trascritti ricorrenti (7 casi).

Per quanto riguarda lo stadio della patologia, 662 pazienti sono stati analizzati esclusivamente alla diagnosi e 65 esclusivamente alla recidiva di malattia (Tabella 11).

	Casi pediatrici (n=261)	Casi adulti (n=454)	Età non nota (n=12)
<b>LAL B</b>			
diagnosi (n=519)	174	333	12
recidiva (n=61)	51	10	0
<b>LAL T</b>			
diagnosi (n=143)	34	109	0
recidiva (n=4)	2	2	0

**Tabella 11-** Casistica dei pazienti analizzati esclusivamente alla diagnosi o esclusivamente alla recidiva.

I restanti campioni sono costituiti da materiale di pazienti prelevati alla diagnosi e ad uno o più punti di recidiva (Tabella 12)

	Casi pediatrici (n=46)	Casi adulti (n=104)
<b>LAL B</b>		
diagnosi	17	46
recidiva	21	52
<b>LAL T</b>		
diagnosi	4	3
recidiva	4	3

**Tabella 12-** Casistica analizzata alla diagnosi e ad uno o più punti della recidiva di malattia.

## Amplicon sequencing

Per identificare le mutazioni a carico del gene *TP53* è stata utilizzata la piattaforma di NGS GS Junior 454 Roche, descritta in precedenza (vedi capitolo 2).

La piastra usata per la creazione della *sequencing library* è stata disegnata e prodotta appositamente per questo progetto: essa consente di analizzare contemporaneamente gli esoni del gene da 4 a 11, in 11 campioni. Ad ogni colonna della piastra corrisponde un campione (eccetto la colonna 12 che costituisce il controllo negativo), mentre alle righe corrispondono i differenti esoni. Ad ognuno degli 11 campioni viene assegnato un MID differente, in modo che ci sia una corrispondenza univoca tra le sequenze ottenute ed i campioni analizzati.

Ognuno dei 96 pozzetti contiene al suo interno il primer per l'esone analizzato, al quale sono già stati legati sia l'adattatore che la sequenza MID (Figura 18).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Esone 4	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 5	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 6	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 7	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 8	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 9	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 10	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -
Esone 11	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	CTR -

MID 1	MID 2	MID 3	MID 4	MID 5	MID 6	MID 7	MID 8	MID 10	MID 11	MID 13	MID 13
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------

**Figura 18-** Schema della piastra utilizzata per l'individuazione delle mutazioni di *TP53*. Vengono valutati simultaneamente gli esoni 4-11 in 11 campioni differenti, identificati dai MID.

Per ogni amplicone sono stati utilizzati 40 ng di DNA genomico con cui si è eseguita la reazione di amplificazione. Al termine della PCR, volumi prestabiliti di ogni amplicone sono stati uniti in modo da costituire un *pool* unico, in seguito purificato e quantificato attraverso l'utilizzo di *PicoGreen® dsDNA quantitation Assay Kit*. In base al risultato della quantificazione, il *pool* è poi stato diluito in modo da ottenere una congrua quantità di

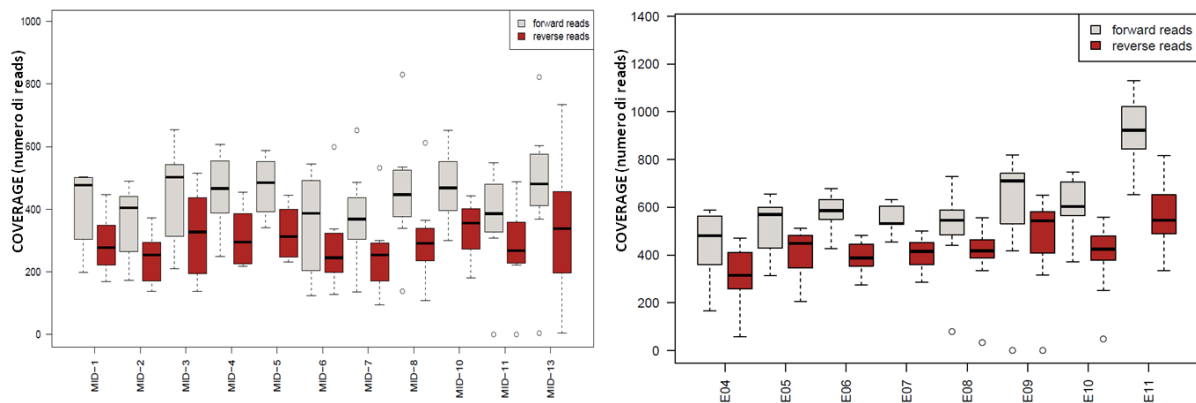
molecole per poter proseguire con le fasi successive dell'esperimento (*emulsion PCR* e sequenziamento, precedentemente descritte).

Ogni centro partecipante ha eseguito gli esperimenti sui propri campioni, in maniera individuale; i risultati sono stati poi centralizzati per l'esecuzione di un'analisi globale su tutti i dati ottenuti.

### Controllo di qualità ed analisi dei dati

Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati due software distinti: il *GS Amplicon Variant Analyzer* (AVA-Roche 454) fornito insieme allo strumento, ed il *Sequence Pilot* (JSI Medical Systems). È stata utilizzata come referenza la sequenza del gene *TP53* ENSG00000141510. Solo le varianti presenti con una frequenza  $\geq 2\%$  sono state incluse nell'analisi.

La prima fase dell'analisi dei dati è rappresentata da un controllo di qualità (QC). Le piastre che presentavano un numero di *reads* totali inferiori alle 80000, ed i singoli campioni aventi un *coverage* (numero di *reads*) inferiore ad 80 in *forward* ed in *reverse* sono stati esclusi dall'analisi. Dapprima i MID e gli esoni sono stati analizzati separatamente per ogni singola piastra, al fine di valutare l'efficienza dell'esperimento (Figura 19). L'efficienza di ogni esone è stata poi controllata per singolo paziente (MID).



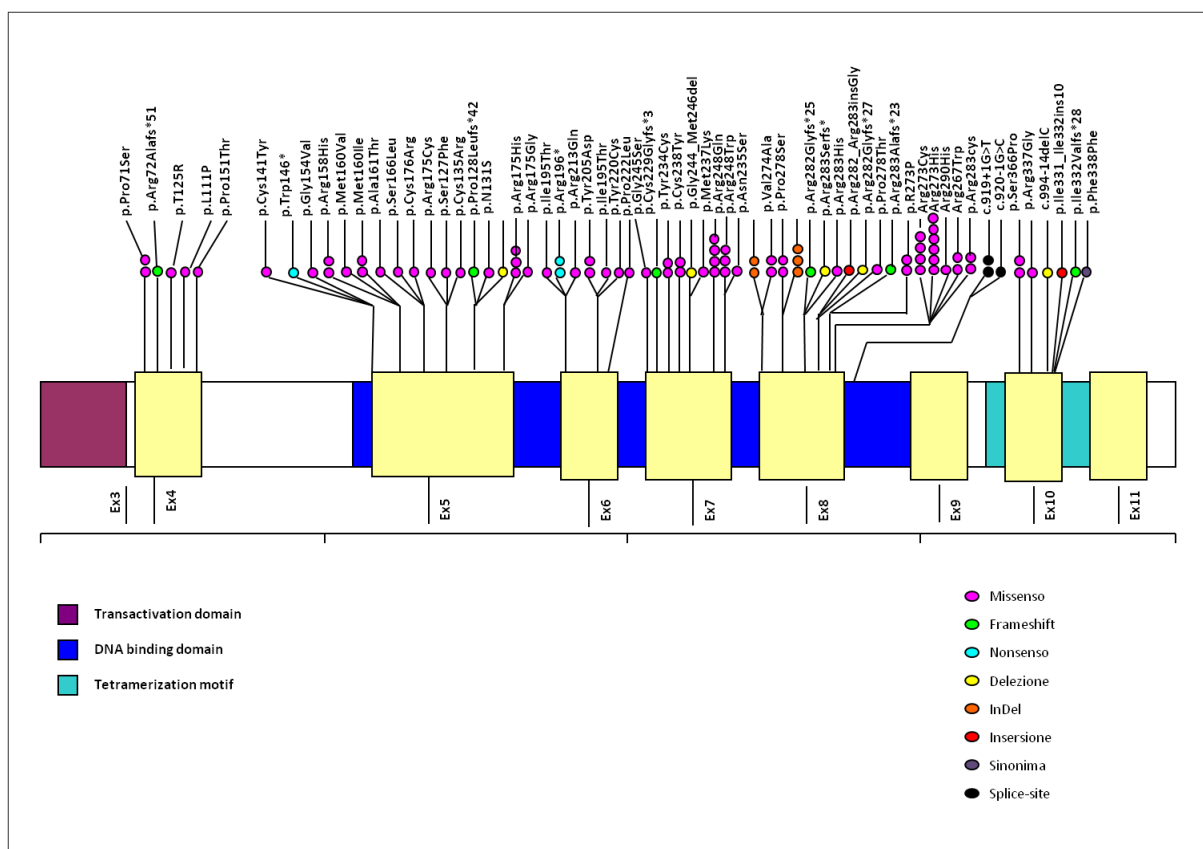
**Figura 19-** Esempio di Quality Control (QC): *coverage* di ogni MID (a sinistra) e di ogni esone (a destra) per una piastra.



## 4.2.2 Risultati

Attraverso l'utilizzo della piattaforma di NGS GS Junior 454 Roche, nella nostra casistica sono state identificate 63 varianti totali. Di queste, 43 erano costituite da mutazioni missenso (68.2%), 7 da mutazioni frameshift (11.1%), 8 da inserzioni/delezioni (12.7%), 2 da mutazioni nonsense (3.2%), 1 da una mutazione sinonima (1.6%) e 2 da mutazioni in siti di splicing (3.2%) (Figura 20).

Gli esoni più frequentemente coinvolti erano l'esone 5, il 7 e l'esone 8, interessati con una frequenza del 27% (17/63), 14.3% (9/63) e 27% (17/63), rispettivamente.



**Figura 17-** Varianti identificate e rispettiva localizzazione sul gene *TP53* nella casistica analizzata, suddivise per tipologia di mutazione.

Nella tabella seguente (Tabella 13) sono elencate in dettaglio tutte le varianti rilevate.

Esone	Cambio nucleotidico	Cambio AA	Tipo	Covearg e range	Frequenza (# pz)	Status
8	c.817C>T	p.Arg273Cys	M	5%-83%	4	dbSNP-variante patog.
7	c.743G>A	p.Arg248Gln	M	6%-47%	4	dbSNP-variante patog.
8	c.818G>A	p.Arg273His	M	17%-93%	6	dbSNP-variante patog.
5	c.524G>A	p.Arg175His	M	19%-46%	3	dbSNP-variante patog.
4	c.451C>A	p.Pro151Thr	M	79%	1	dbSNP, non riportato in IARC
7	c.742C>T	p.Arg248Trp	M	74-94%	3	dbSNP-variante patog.
7	c.704A>G	p.Asn235Ser	M	13%	1	dbSNP, non riportato in IARC
7	c.733G>A	p.Gly245Ser	M	5%	1	dbSNP-variante patog.
10	c.1014C>T	p.Phe338Phe	SI	42%	1	db-SNP, non riportato in IARC
8	c.847C>T	p.Arg283Cys	M	60%-66%	2	db-SNP, non riportato in IARC
8	c.869G>A	p.Arg290His	M	52%	1	db-SNP, non riportato in IARC
8	c.799C>T	p.Arg267Trp	M	3%-7%	2	SNP non validato
6	c.665C>T	p.Pro222Leu	M	87%	1	SNP non validato
5	c.523C>G	p.Arg175Gly	M	77%	1	SNP non validato
10	c.1096T>C	p.Ser366Pro	M	6%-49%	2	Mutazione validata
4	c.211C>T	p.Pro71Ser	M	20%-57%	2	Mutazione validata
4	c.214delC	p.Arg72Alafs*51	F	7%	1	Sconosciuta
5	c.422G>A	p.Cys141Tyr	M	16%	1	Mutazione validata
5	c.437G>A	p.Trp146*	N	94%	1	Mutazione validata
5	c.461G>T	p.Gly154Val	M	8%	1	Mutazione validata
5	c.473G>A	p.Arg158His	M	37%-81%	2	Mutazione validata
5	c.478A>G	p.Met160Val	M	4%	1	Mutazione validata
5	c.480G>A	p.Met160Ile	M	46%	1	Mutazione validata
5	c.481G>A	p.Ala161Thr	M	14%	1	Mutazione validata
5	c.497C>T	p.Ser166Leu	M	37%	1	Mutazione validata
5	c.526T>C	p.Cys176Arg	M	83%	1	Mutazione validata
6	c.584T>C	p.Ile195Thr	M	32%	1	Mutazione validata
6	c.586C>T	p.Arg196*	N	9%-70%	2	Mutazione validata
6	c.638G>A	p.Arg213Gln	M	4%	1	Mutazione validata
7	c.684_685insGGGGTTTGACC	p.Cys229Glyfs*3	F	22%	1	Sconosciuta
7	c.701A>G	p.Tyr234Cys	M	4%-79%	2	Mutazione validata
7	c.713G>A	p.Cys238Tyr	M	36%-49%	2	Mutazione validata
8	c.817_821delinsGACCC	p.Ala273_Ala274delinsAsp	INDEL	51%-72%	2	Sconosciuta
8	c.821T>C	p.Val274Ala	M	90%	2	Mutazione validata
8	c.832C>T	p.Pro278Ser	M	11-21%	2	Mutazione validata
8	c.838_844delinsCCCGACGGAG	p.Arg280_Arg282delins4	INDEL	4%-85%	3	Sconosciuta
8	c.843_844insGGAA	p.Arg282Glyfs*25	F	54%	1	Sconosciuta
8	c.846_847insAGTAGGG	p.Arg283Serfs*?	INDEL	42%	1	Sconosciuta
8	c.848G>A	p.Arg283His	M	11%	1	Mutazione validata
Intr-08	c.919+1G>T	-	S	31%-42%	2	Mutazione validata
Intr-08	c.920-1G>C	-	S	62%	1	Mutazione validata
5	c.523C>T	p.Arg175Cys	M	47%	1	Mutazione validata
7	c.730_738delGGCGGCATG	p.Gly244_Met246del	D	85%	1	Sconosciuta
6	c.613T>G	p.Tyr205Asp	M	65%-83%	2	Mutazione validata
5	c.380C>T	p.Ser127Phe	M	34%	1	Mutazione validata
7	c.710T>A	p.Met237Lys	M	49%	1	Mutazione validata
8	c.846_847insGGG	p.Arg282_Arg283insGly	I	2%	1	Sconosciuta

10	c.1009C>G	p.Arg337Gly	M	77%	1	Mutazione validata
8	c.844_852delins19	p.Arg282Glyfs*27	INDEL	67%	1	Sconosciuta
5	c.403T>C	p.Cys135Arg	M	91%	1	Mutazione validata
8	c.832C>A	p.Pro278Thr	M	82%	1	Mutazione validata
5	c.383delC	p.Pro128Leufs*42	F	33%	1	Sconosciuta
6	c.584T>C	p.Ile195Thr	M	25%	1	Mutazione validata
8	c.846dupG	p.Arg283Alafs*23	F	3%	1	Sconosciuta
10	r.994-1_994ins30	p.Ile331_Ile332ins10	I	17%	1	Sconosciuta
10	r.994-1_994ins44	p.Ile332Valfs*28	F	33%	1	Sconosciuta
4	c.374C>G	p.T125R	M	80%	1	Mutazione validata
6	c.659A>G	p.Y220C	M	4%	1	Mutazione validata
4	c.332T>C	p.L111P	M	14%	1	Mutazione validata
5	c.392A>G	p.N131S	M	2%	1	Mutazione validata
8	c.818G>C	p.R273P	M	3%-29%	2	Mutazione validata
5	c.376-8_379delTCCTACAGTACT	-	INDEL	15%	1	Sconosciuta
10	c.994-14delC	-	F	9%	1	Sconosciuta

**Tabella 13-** Tabella riassuntiva delle varianti identificate nella nostra casistica. Le colonne indicano: esone coinvolto; cambio nucleotidico; variazione amminoacidica; tipo di mutazione (M= missenso, F= frameshift, I= inserzione, D= delezione, SI= sinonima, S= splice-site); coverage o range del coverage nel caso la variante sia presente in più di un paziente; annotazione nei principali database.

Successivamente, al fine di indagare l'eventuale presenza di differenze nella frequenza delle mutazioni all'interno dei sottogruppi immunofenotipici e molecolari, la nostra analisi si è concentrata solamente su quelle varianti riconosciute come mutazioni. Focalizzandoci sul gruppo dei pazienti valutati esclusivamente alla diagnosi di malattia, la frequenza delle mutazioni di *TP53* è risultata sovrapponibile nel sottogruppo delle LAL B e T, con valori del 4.23% (22/519) nelle LAL a fenotipo B e del 4.19% (6/143) in quelle a fenotipo T.

Nell'ambito delle LAL B (Tabella 14), le mutazioni sono state individuate con frequenze variabili nei diversi sottogruppi molecolari: 0.9% nei casi *BCR/ABL1+* (1/109), 7.5% nei casi aventi riarrangiamenti del gene *MLL* (4/53), 5.5% negli *E2A/PBX1+* (1/18), 3.3% *ETV6/RUNX1+* (1/30) e 4.5% nei casi negativi per i suddetti trascritti (13/289). Per meglio caratterizzare quest'ultimo gruppo, sono stati considerati anche i dati di citogenetica disponibili ed è emerso che il 20% dei casi a cariotipo ipodiploide presentavano mutazioni del gene *TP53* (2/10).

	Casi pediatrici (n=174)		Casi adulti (n=333)		Età non nota (n=12)	
	TP53 mutati/wt		TP53 mutati/wt		TP53 mutati/wt	
<b>LAL B diagnosi (n=519)</b>						
Riarrangiamenti <i>MLL</i> (n=53)	0	11	4	37	0	1
<i>BCR/ABL</i> (n=109)	0	9	1	95	0	4
<i>E2A/PBX1</i> (n=18)	1	11	0	6	0	0
<i>ETV6/RUNX1</i> (n=30)	1	29	0	0	0	0
Negativi per trascritti ricorrenti (n=289)	3	108	9	162	1	6
Dato molecolare non noto (n=20)	0	1	3	16	0	0

**Tabella 14-** Dettaglio dei casi LAL B mutati suddivisi per sottogruppo molecolare.

In seguito si è voluta indagare l'eventuale presenza di una correlazione tra la frequenza di mutazioni e lo stadio della malattia. Date le importanti differenze nell'andamento clinico e nell'intensità dei regimi terapeutici seguiti, l'analisi è stata condotta separatamente sulle due casistiche di pazienti pediatrici ed adulti.

Per quanto riguarda il confronto tra i pazienti affetti da LAL B valutati esclusivamente alla diagnosi e quelli alla recidiva, l'andamento delle mutazioni di *TP53* è risultato simile nelle due casistiche, con un aumento significativo dell'incidenza delle mutazioni nei casi alla recidiva in entrambi i gruppi. Nella casistica di pazienti pediatrici, le alterazioni del gene sono state infatti evidenziate in 4/174 casi alla diagnosi (2.3%) ed in 6/72 casi alla recidiva (8.3%), con *p value* pari a 0.03; negli adulti, in maniera simile, la frequenza di mutazioni rilevate alla diagnosi è del 5.1% (17/333), mentre alla recidiva del 12.9 (8/62), con *p*= 0.03.

Un trend simile è stato osservato anche nei pazienti affetti da LAL T, ma dato l'esiguo numero dei casi valutati alla recidiva, non è stato possibile stabilirne la significatività statistica (vedi Tabella 15).

	Casi pediatrici (286)		Casi adulti (509)		Età non nota (n=12)	
	TP53 mutati/wt		TP53 mutati/wt		TP53 mutati/wt	
<b>LAL B (n=653)</b>						
diagnosi (n=519)	4	170	17	316	1	11
recidiva totali (n=134)	6	66	8	54	0	0
<b>LAL T (n=154)</b>						
diagnosi (n=143)	2	32	4	105	0	0
recidive totali (n=11)	2	4	1	4	0	0

**Tabella 15-** Distribuzione delle mutazioni suddivise in base allo stadio della malattia.

### 4.2.3 Discussione

Lo scopo dello studio IRON II è stato quello di analizzare, attraverso l'utilizzo della piattaforma di NGS Roche 454, l'impatto prognostico di mutazioni a carico di geni aventi un significato patogenetico riconosciuto, in pazienti affetti da neoplasie ematologiche.

Numerosi studi si sono concentrati nel tempo sulla valutazione del ruolo svolto dal gene oncosoppressore *TP53* sulla patogenesi di diverse patologie tumorali, in particolare, nell'ambito delle malattie oncoematologiche, tali alterazioni sono state indagate nella LAM e nella LLC. In entrambe queste patologie, la presenza di mutazioni si è dimostrata associata ad un andamento sfavorevole, frequentemente correlato a fenomeni di resistenza alla chemioterapia (Haferlach C. *et al*, Leukemia 2008; Rossi D. *et al*, Clin Cancer Res 2009).

Pochi sono invece i lavori che si sono concentrati sull'analisi dello stato mutazionale di questo gene nella LAL, e si riferiscono in misura maggiore a casistiche pediatriche.

Nell'ambito del progetto IRON II, il nostro gruppo ha coordinato uno studio volto a definire l'incidenza delle alterazioni di *TP53* in una vasta casistica di pazienti pediatrici ed adulti affetti da LAL, provenienti da numerosi centri europei ed asiatici.

I campioni analizzati sono stati infatti collezionati in 10 laboratori internazionali, in modo da includere nello studio un numero molto ampio di pazienti, eterogenei per provenienza, caratteristiche clinico-biologiche e trattamenti eseguiti.

Inoltre, il carattere di internazionalità che contraddistingue lo studio, è risultato dirimente nella valutazione dell'efficienza e della praticità di utilizzo della metodica, soprattutto in vista di un suo potenziale utilizzo nello screening delle alterazioni del gene *TP53*, all'interno dell'algoritmo diagnostico delle LAL.

In totale sono stati raccolti ed analizzati 949 campioni, di cui 877, pari al 92.41%, sono risultati idonei per l'inclusione nello studio dopo il controllo di qualità. Questo primo risultato dimostra l'applicabilità della tecnologia 454 nel sequenziamento del gene *TP53*, confermandone la vantaggiosità sia in termini di risultati ottenuti (profondità di sequenziamento) che di rapidità di esecuzione (Kohlmann A. *et al*, Leukemia 2011). Per quanto riguarda il criterio di selezione dei pazienti da includere nello studio, la scelta è stata effettuata in modo da ottenere un numero congruo di casi, sia pediatrici che adulti, per ogni categoria immunofenotipica e molecolare: questo al fine di valutare eventuali differenze nell'incidenza delle mutazioni in questi sottogruppi.

Una prima analisi condotta su 662 casi valutati esclusivamente alla diagnosi di malattia, non ha mostrato differenze significative nell'incidenza di mutazioni all'interno dei due sottogruppi fenotipici: infatti, le alterazioni di *TP53* sono state identificate nel 4.2% delle LAL B e delle LAL T.

Nell'ambito dei diversi sottogruppi molecolari, l'analisi è stata eseguita unicamente sui casi LAL B, poiché il dato molecolare riguardante i pazienti a fenotipo T presentava un'eccessiva variabilità nei trascritti presi in esame, ed era inoltre non esaustiva.

La maggior frequenza di mutazioni è stata rilevata nei gruppi di pazienti LAL B positivi per riarrangiamenti del gene *MLL*, per il trascritto *E2A/PBX1* e nei casi con biologia molecolare negativa per i geni di fusione ricorrenti nella LAL, con valori pari al 7.5%, 5.5% e 4.5%, rispettivamente.

Questo risultato è in accordo con quanto riportato da Hof *et al*, che ha descritto un'associazione significativa tra la presenza di mutazioni di *TP53* e la positività al trascritto *MLL/AF4* in una casistica di pazienti pediatrici valutati alla recidiva (Hof J. *et al*, J Clin Oncol. 2011). Al contrario, tale dato non conferma quanto evidenziato in uno studio precedentemente eseguito dal nostro gruppo, basato sull'utilizzo della metodica *array* Amplichip p53 (vedi paragrafo 4.1.2). Questa discordanza è probabilmente da attribuire alla selezione della casistica analizzata, che comprendeva un numero esiguo di casi *MLL/AF4+*: viene invece confermata la maggiore frequenza di mutazioni nei casi negativi per i geni di fusione noti, che risultava pari al 13% nei casi B e T, complessivamente (Chiaretti *et al*, Haematologica 2013).

Un altro dato di rilievo è rappresentato dall'associazione tra la presenza di mutazioni di *TP53* ed un cariotipo ipodiploide: nel nostro studio infatti, i dati di cariotipo hanno mostrato che il 20% dei casi ipodiploidi- valutati mediante citogenetica convenzionale o DNA-index- che non presentavano altri trascritti molecolari, sono risultati mutati. Questo è in linea con quanto recentemente riportato in letteratura da due studi (Holmfeldt L. *et al*, Nat. Genet 2013; Muhlbacher *et al*, Genes Chromosomes Cancer. 2014), che hanno evidenziato mutazioni/delezioni del gene con frequenza >90% nei casi con cariotipo ipodiploide, sia pediatrici che adulti. La minore frequenza osservata nella nostra casistica è probabilmente dovuta al fatto che la nostra analisi ha valutato esclusivamente le mutazioni, e non le delezioni di *TP53*.

Per quel che riguarda invece l'associazione con lo stadio della malattia, è stato osservato un incremento significativo della frequenza di mutazioni alla recidiva, sia nel gruppo di pazienti pediatrici che negli adulti. Focalizzandoci sulla valutazione dei casi LAL B alla ricaduta infatti, in entrambe le casistiche la frequenza di mutazioni alla recidiva risulta più di tre volte maggiore rispetto alla diagnosi. Un andamento simile è stato evidenziato anche nelle LAL T, nelle quali la scarsa numerosità dei casi alla recidiva non ha consentito il raggiungimento della significatività statistica. Esperimenti su casi aggiuntivi di LAL a fenotipo T alla recidiva sono tuttora in corso, al fine di validare questo dato.

L'analisi di casi valutati sia alla diagnosi che alla recidiva ha inoltre evidenziato la necessità di uno studio condotto su materiale *paired*, laddove possibile, per poter dimostrare se le mutazioni del gene siano acquisite al momento della ricaduta, o se siano presenti già all'esordio della malattia in un clone minoritario di cellule. Infatti, risultati preliminari evidenziano che in un porzione di casi che presentano la mutazione alla ricaduta di malattia, la mutazione è già presente in una percentuale al di sotto della soglia di rilevazione nel campione della diagnosi. Questo potrebbe facilitare l'identificazione di gruppi di pazienti *TP53* mutati a maggiore rischio di ricaduta.

In conclusione, questo studio, condotto su un'ampia ed eterogenea coorte di LAL, ha dunque mostrato l'utilità della metodica NGS Roche 454 nello screening mutazionale del gene *TP53* e la potenziale applicabilità di questa indagine nell'algoritmo diagnostico della LAL all'esordio. In particolare, grazie all'utilizzo di questa tecnologia, è stato possibile rilevare mutazioni presenti con una frequenza molto bassa, riferibili a piccoli subcloni di cellule neoplastiche, non altrimenti rilevabili con le tradizionali metodiche di sequenziamento.

Analisi di correlazione con l'outcome sono in corso, allo scopo di valutare l'impatto delle mutazioni di questo gene sulla prognosi dei pazienti affetti da LAL: ciò consentirà di identificare pazienti a più alto rischio di recidiva, in particolar modo all'interno di sottogruppi molecolari storicamente caratterizzati da un andamento sfavorevole, come i casi aventi riarrangiamenti del gene *MLL*, quelli con cariotipo complesso o ipodiploide e le LAL a fenotipo T; inoltre, nei sottogruppi senza alterazioni molecolari note, potrebbe permettere di identificare un sottogruppo di pazienti a maggior rischio di recidiva, per i quali

si potrebbe pianificare uno stretto monitoraggio della malattia minima residua ed un approccio terapeutico più aggressivo.

Un dato interessante, emerso da un'analisi preliminare, riguarda la frequenza del polimorfismo Arg72Pro (rs1042522), sito nel codone 72, che nella nostra casistica è riscontrato in più del 40% dei casi. L'associazione tra questo SNP e l'insorgenza di neoplasie è stata oggetto di numerosi studi in varie patologie tumorali (Alawadi S *et al*, *Med Oncol* 2011; De Moura Gallo CV *et al*, *Mutation Res* 2005; Carvalho RM *et al*, *J Neurooncol* 2012); un recente lavoro svolto su una casistica di LAL pediatriche, ha evidenziato il possibile ruolo patogenetico svolto da questa alterazione nello sviluppo della LAL nel bambino (De Lourdes Perim A *et al*, *Mol Biol Rep* 2013). Una meta-analisi è in corso per valutare il possibile ruolo predisponente di questa variante, tanto nel bambino che nell'adulto.

Infine, come ulteriore estensione del corrente progetto stiamo valutando la possibilità di eseguire studi aggiuntivi su materiale germinale, al fine di identificare gruppi di rischio nei quali la presenza di alterazioni a carico del gene *TP53* nelle cellule non leucemiche possa rappresentare un fattore predisponente l'insorgenza della leucemia stessa.



## Bibliografia

- Aas T, Børresen AL, Geisler S, et al: Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med.* 1996; 2(7):811-4.
- Alawadi S, Ghabreau L, Alsaleh M, et al. P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women. *Med Oncol.* 2011; 28(3):709-15.
- Arjonen A, Kaukonen R, Mattila E, et al. Mutant p53-associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest.* 2014.
- Attarbaschi A, Morak M, Cario G, et al. Treatment outcome of CRLF2-rearranged childhood acute lymphoblastic leukaemia: a comparative analysis of the AIEOP-BFM and UK NCRI-CCLG study groups. *Br J Haematol.* 2012;158(6):772-7.
- Barckhausen C, Roos WP, Naumann SC, et al. Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene.* 2013
- Béné MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett.* 2005; 98(1):9-21.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33(4):451-8.
- Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia.* 2012; 26(2):265-70.
- Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest.* 2005; 23(1):60-75.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:2059-2074.

Cario G, Zimmermann M, Romey R, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood* 2010; 115:5393-5397.

Carvalho RM, Pinto GR, Yoshioka FK, et al. Prognostic value of the TP53 Arg72Pro single-nucleotide polymorphism and susceptibility to medulloblastoma in a cohort of Brazilian patients. *J Neurooncol.* 2012; 110(1):49-57.

Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, et al. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. *Leukemia* 2006; 20:1238-1244.

Chen IM, Harvey RC, Mullighan CG, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2012; 119(15):3512-22.

Chiaretti S , Li X, Gentleman R, Vitale A, Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. *Blood.* 2004; 103(7):2771-8.

Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavolaro S, et al. TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica* 2013; 98(5):59-61

Chiaretti S, Foà R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2009; 94(2):160-2.

Chiaretti S, Li X, Gentleman R, et al. Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7209-7219

Chiaretti S, Messina M, Tavolaro S, et al. Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223. *Haematologica* 2010; 95:1114-1121

Chiaretti S, Tavoraro S, Marinelli M, et al. Evaluation of TP53 mutations with the AmpliChip p53 research test in chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical outcome and gene expression profiling. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50(4):263-74

Chiaretti S, Vitale A, Cazzaniga G, et al. Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *Haematologica*. 2013; 98(11):1702-10.

Cordone I, Masi S, Mauro FR, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998; 91(11):4342-9.

Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009; 10:147-156.

de Lourdes Perim A, Guembarovski RL, Oda JM, et al. CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Mol Biol Rep*. 2013; 40(7):4591-6.

de Moura Gallo CV, Azevedo E Silva Mendonça G, de Moraes E, et al TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res*. 2005; 589(3):192-207.

De Keersmaecker K, Graux C, Odero MD, et al. Fusion of EML1 to ABL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia with cryptic t(9;14)(q34;q32). *Blood*. 2005; 105:4849-4852.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; 360:2289–2301.

Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009; 10:125-134.

Dik WA, Brahim W, Braun C, et al. CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. *Leukemia* 2005; 19:1948-57

Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood*. 2011; 117(7):2129-36

Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011; 208(7):1389-401.

Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998; 91(11):3995-4019

Fenaux P, Preudhomme C, Quiquandon I, et al. Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Hematology* 1992; 80(2):178-83.

Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1:75-87.

Foà R, Vitale A, Vignetti M, Meloni G, et al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011; 118(25):6521-8.

Graux C, Cools J, Melotte C, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2004; 36:1084-1089.

Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 193–203.

Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997; 349: 344–49.

Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB et al. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood* 2011; 118:6153-6163.

Haferlach C, Dicker F, Herholz H, et al. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008; 22(8):1539-41.

Harvey RC, Mullighan CG, Wang X et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2010; 116(23):4874-84.

Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood* 2010; 115:1006-1117.

Hof J, Krentz S, van Schewick C et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29(23):3185-93.

Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al: The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013; 45(3):242-52.

Hong D, Gupta R, Ancliff P, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*. 2008; 319(5861):336-9.

Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012; 30:63–69

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*. 2013 381:1943-1955.

Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX et al. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 1999; 23(2):115–26.

Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene*. 2004; 23;23(38):6341-8.

Knudsen ES, Gopal P, Singal AG. The Changing Landscape of Hepatocellular Carcinoma: Etiology, Genetics, and Therapy. *Am J Pathol*. 2014; 184(3):574-583.

Kohlmann A, Klein HU, Weissmann S, et al. The Interlaboratory RObustness of Next-generation sequencing (IRON) study: a deep sequencing investigation of TET2, CBL and KRAS mutations by an international consortium involving 10 laboratories. *Leukemia*. 2011; 25(12):1840-8.

Krentz S, Hof J, Mendioroz A et al. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27(2):295-304.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822):860-921.

Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363:2424-2433.

Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, et al. Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia*. 2003 ;17(11):2202-6.

Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5202-7.

Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013; 45(3):290-4.

Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012; 30(25):3100-8.

Mühlbacher V, Zenger M, Schnittger S, et al. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014.

Mullighan CG, Downing JR. Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future direction. *Leukemia*. 2009 Jul;23(7):1209-18.

Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Jan 29;360(5):470-80.

Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389-96

Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012:389-96.

Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, et al. Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2245-53.

Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication *J Clin Oncol*. 2010; 28:3636-3643.

Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat*. 2003; 21(3):277-84.

Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al: TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007; 357(25):2552-61.

Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol*. 2008; 9(3):257-68.

Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006; 354:166-1678.

Pui CH, Pei D, Campana D et al. Improved prognosis for older adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29(4):386-91.

Pui CH, Robison LL, Look TA. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2008; 371: 1030–43.

Pui CH. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:142-6.

Roberts KG, Morin RD, Zhan J, et al. Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2012; 22, 153–166.

Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(2):153-66.

Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3):995-1004.

Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014.

Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013; 121(8):1403-12.

Rubnitz JE, Campbell P, Zhou Y et al. Prognostic impact of absolute lymphocyte counts at the end of remission induction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2013; 119(11):2061-6.



Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 114:2688-2698.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12):5463-7.

Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group Study AALL0031. *Leukemia*. 2014 .

Shah S, Schrader KA, Waanders E et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013; 45(10):1226-31.

Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet* 2010; 42: 492–94.

Tang JL, Tien HF, Lin MT, et al. Frequent p53 mutation in relapsed acute lymphoblastic leukemia with cytogenetic instability: a longitudinal analysis. *Anticancer Res*. 1998; 18(2B):1273-8

Thomas DA, Faderl S, Cortes J, O'Brien S, et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood*. 2004; 103(12):4396-407.

Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 364(24):2305-15.

Toledano SR, Lange BJ. Ataxia-telangiectasia and acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1980 ;45(7):1675-8.

Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*. 2013; 19(3):368-71.

Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A et al. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med* 2011; 208:2571-2579.

Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H et al. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2010; 42(4):338-42.

Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2008; 111:4668-4680.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009; 114(5):937-51

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 292(5523):1838.

Vignetti M, Fazi P, Cimino G, Martinelli G, et al. Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) LAL0201-B protocol. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3676-8.

Volkert S, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Association of the type of 5q loss with complex karyotype, clonal evolution, TP53 mutation status, and prognosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014; 53(5):402-10.

Wada M, Bartram CR, Nakamura H, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood.* 1993; 82(10):3163-9.

Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150:264-278.

Yang JJ, Cheng C, Yang W, et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 2009; 301: 393–403.

Yang W, Trevino LR, Yang JJ, et al. ARID5B SNP rs10821936 is associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in blacks and contributes to racial differences in leukemia incidence. *Leukemia* 2010; 24: 894–96.

Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:252-257.

Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010; 28(29):4473-9.

Zhu YM, Foroni L, McQuaker IG, et al. Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 1999; 79(7-8):1151-7.

Zwaan CM , Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(1):19-34.

## Publicazioni

Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavolaro S, Bonina S, Paoloni F, Marinelli M, Patten N, Bonifacio M, Kropp MG, Sica S, Guarini A, Foà R. "TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy". *Haematologica* 2013 May;98(5):e59-61.

Cecinati V, Brugnoletti F, D'Angiò M, De Nicolò MC, De Vellis A, Coluzzi S, Testi AM. "Autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenia as unusual presentations of childhood Hodgkin lymphoma: a case report and review of the literature". *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012 May;34(4):280-2.

Brugnoletti F, Morris EB, Laningham FH, Patay Z, Pauley JL, Pui CH, Jeha S, Inaba H. "Recurrent intrathecal methotrexate induced neurotoxicity in an adolescent with acute lymphoblastic leukemia: Serial clinical and radiologic findings". *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Feb;52(2):293-5.

## Abstracts

Gianfelici V., Chiaretti S., Atak Z.K., Brugnoletti F., Messina M., Hulselmans G., De Keersmaecker K., Geerdens E., Mancini M., Vitale A., Elia L., Matarazzo M., Rossi D., Gaidano G., Guarini A., Aerts S., Cools J., Foà R. "Whole Transcriptome Sequencing In Refractory T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia".  
Oral Session: ASH 55th Annual Meeting. New Orleans LA, 7-10 Dicembre 2013

Brugnoletti F., Chiaretti S., Bontempi K., Elia L., Negulici A., Vignetti M., Vitale A., Guarini A., Foà R. "Analysis of *CRLF2* expression in a cohort of 91 newly diagnosed adult patients with b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: correlation with clinico-biological features and outcome"  
Poster Session: 18th EHA Annual Congress. Stoccolma, Svezia, 13-16 Giugno 2013.

Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavolaro S, Bonina S, Paoloni F, Marinelli M, Della Starza I, Negulici A, Vitale A, De Propriis MS, Elia L, Vignetti M, Bonifacio M, Kropp M, Sica S, La Starza R, Pizzolo G, Molica S, Leone G, Meloni G, Testi AM, Guarini A, Foà R. "TP53 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) are relatively frequent in molecularly negative cases of both B- and T-lineage and correlate with poor response to induction therapy".  
Poster session: 17th EHA Annual Congress. Amsterdam, Olanda, 14-17 Giugno 2012.

Tavolaro S, Chiaretti S, Peragine N, Bonina S, Brugnoletti F, Santangelo S, Marinelli M, Del Giudice I, Mauro FR, Guarini A, Foà R. "BCR stimulation induces a differential microRNA (miR) profiling between B lymphocytes derived from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients and healthy donors".

Poster session: 16th EHA Annual Congress. Londra, UK, 9-12 Giugno 2011.