



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXVIII

*Utilità clinica dell'array-CGH nello studio di pazienti in età pediatrica con
Leucemia Linfatica Acuta*

Settore scientifico disciplinare MED/03

<i>Presentata da:</i>	<i>Dott.ssa Stefania Rassu</i>
<i>Coordinatore Dottorato</i>	<i>Prof. Paolo Moi</i>
<i>Tutor/ Relatore</i>	<i>Prof.ssa M. Cristina Rosatelli</i>
<i>Correlatore</i>	<i>Dott.ssa Daniela Gasperini</i>

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

Indice

1) Introduzione	pag 2
1.1 Le Leucemie	pag 2
1.2 La Leucemia Linfoblastica Acuta in età pediatrica	pag 3
- 1.2.1 Le anomalie cromosomiche nella LLA	pag 4
1.3 La citogenetica	pag 5
- 1.3.1 La citogenetica classica	pag 5
- 1.3.2 L'Ibridazione in Situ Fluorescente	pag 6
- 1.3.3 L'array-CGH	pag 6
2) Materiali e metodi	pag 8
2.1 Pazienti	pag 8
2.2 Colture cellulari e citogenetica	pag 9
2.3 Ibridazione In Situ Fluorescente	pag 9
2.4 Estrazione del Dna da midollo	pag 10
2.5 array-CGH	pag 10
3) Risultati	pag 12
4) Discussione	pag 29
5) Conclusioni	pag 32
6) Bibliografia	pag 33
7) Ringraziamenti	pag 37

1 Introduzione

1.1 Le leucemie

Le leucemie sono malattie neoplastiche clonali del sistema emopoietico, ossia traggono origine da una singola cellula staminale mutata. La cellula staminale colpita dall'evento neoplastico può trovarsi a vari livelli differenziativi dell'emopoiesi, pertanto può essere mieloide o linfoide (Widmann, 2001). La variabilità clinica della leucemia dipende anche dal mantenimento o dalla soppressione della capacità maturativa e differenziativa della cellula trasformata (Sante Tura, 2011). Ciò comporta clinicamente una distinzione delle leucemie in "acute" o "croniche": le prime sono dovute alla proliferazione di cellule immature non differenziate, hanno esordio improvviso, prognosi più severa e decorso molto rapido, le seconde sono caratterizzate dalla proliferazione di cellule già differenziate, decorrono più lentamente e vengono trattate oggi con un diverso approccio terapeutico. Il momento critico nell'insorgenza e nello sviluppo di una leucemia è l'acquisizione di un vantaggio proliferativo del clone neoplastico nei confronti della normale mielopoiesi (Sante Tura, 2011). I meccanismi che conferiscono al clone trasformato la capacità di auto rinnovarsi in maniera incontrollata determinano l'arresto in una fase specifica dello sviluppo e possono essere dovuti alla trasformazione di un proto-oncogene in oncogene, all'inattivazione di geni oncosoppressori o all'attivazione di proteine con potenziale attività di trascrizione. Lo studio delle alterazioni genetiche e dei meccanismi molecolari alla base della proliferazione e differenziazione cellulare oltre che per la caratterizzazione delle leucemie sono fondamentali per identificare target potenziali per lo sviluppo di strategie terapeutiche personalizzate.

La sintomatologia leucemica è eterogenea: accanto alla sintomatologia sistemica (febbre, astenia, sintomatologia dolorosa osteoarticolare) sono presenti i segni della progressiva insufficienza midollare. L'invasione midollare causa anemia per insufficienza di produzione di globuli rossi, gravi infezioni per ridotta produzione di leucociti neutrofili ed emorragie per ridotta produzione di piastrine. Possono essere associati sintomi più specifici in relazione alla localizzazione d'organo (SNC, testicolo).

Le leucemie hanno un'incidenza del 3% di tutti i tumori maligni e rappresentano la forma più comune di tumore in età pediatrica. L'incidenza delle leucemie tra 0-18 anni risulta essere di 30-45 nuovi casi per milione all'anno nel mondo con prevalenza delle forme acute (Greaves MF 1993). La Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) rappresenta l'80% circa delle leucemie pediatriche, la Leucemia Mieloide Acuta (LMA) il 10% circa e meno del 10% è rappresentato da sindromi mieloproliferative quali la Leucemia Mieloide Cronica (LMC), la Leucemia Mielomonocitica giovanile (JMML) e le Sindromi Mielodisplastiche (SMD).

1.2 La Leucemia Linfoblastica Acuta in età pediatrica

La leucemia linfatica acuta è il più comune e tra i più curabili tumori nel bambino. Essa ha un picco di incidenza intorno ai 2-5 anni di età ed è lievemente più frequente nel sesso maschile (Pui CH., 2008).

Si sviluppa probabilmente per una combinazione tra cause ambientali, suscettibilità genetica e influenza di oncogeni tumorali (Redaelli A, 2005).

La leucemia, come dimostrato per altri tumori, è verosimilmente il risultato di due o più eventi genetici e/o epigenetici indipendenti (Wiemels J 2008). In alcune serie di pazienti è stato visto che la patogenesi molecolare risale all'epoca prenatale: il primo evento avverrebbe infatti prima della nascita e darebbe origine ad un clone linfocitario con un vantaggio proliferativo. E' stata infatti dimostrata la presenza, nel sangue prelevato alla nascita in bambini che hanno in seguito sviluppato una leucemia, di un riarrangiamento clonale dei geni del T-cell receptor (TCR) o delle immunoglobuline (Ig), o della sequenza di un gene di fusione leucemico (Jeffrey W. 2002). Uno o più ulteriori eventi patogenetici che insorgono nel clone mutato sarebbero responsabili del successivo sviluppo della leucemia clinicamente manifesta, da cui l'impossibilità attuale di utilizzare approcci terapeutici specifici. Tuttavia l'uso di schemi di polichemioterapia intensiva e la sempre migliore stratificazione dei pazienti in fasce di rischio è alla base della ottima prognosi dei pazienti in età pediatrica (EFS complessivamente oltre 80% a 5 anni), nettamente superiore a quella degli adulti che si spiega anche con una frequenza inferiore delle alterazioni genetiche, alla presenza nel DNA di alterazioni con prognosi favorevole, a un ridotto numero di alterazioni genetiche avverse (Chiaretti S. 2013). I riarrangiamenti con prognosi negativa quali t(9;22) e delezione del gene IKZF1 aumentano la frequenza già nell'adolescenza, età in cui i pazienti hanno una risposta alla terapia peggiore rispetto ai più piccoli (Inaba H. 2013).

La diagnosi e la classificazione delle LLA vengono fatte utilizzando le indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) attraverso una serie di indagini che accanto ai più classici aspetti citomorfologici (classificazione FAB) e citochimici definiscono la caratterizzazione immunofenotipica in citofluorimetria (LLA pB, LLA T, MPAL, AUL) permettendo la classificazione più precisa dei blasti in relazione alla presenza e alla differenziazione degli antigeni di superficie ed intracitoplasmatici linfocitari con infine la caratterizzazione citogenetica e molecolare. In questo modo è possibile stratificare i pazienti.

Lo studio del profilo genico dei blasti leucemici attraverso tecniche quali SNPs e oligo arrays e il sequenziamento massivo con NGS oltre a meglio definire i processi di trasformazione, costituisce la base per identificare lesioni target da utilizzare in approcci terapeutici personalizzati.

Oltre che con la caratterizzazione biologica dei blasti leucemici i protocolli terapeutici attualmente in uso stratificano i pazienti in base alla risposta alla terapia intesa come studio della persistenza di malattia residua minima (MRD) valutata con

tecniche di citofluorimetria (FCM MRD) o biologia molecolare (MRD PCR) a ben definiti timepoints. Tale parametro si è dimostrato ad oggi il più efficace strumento per identificare pazienti ad elevato rischio di recidiva (Brüggemann M., 2012).

1.2.1 Le anomalie cromosomiche nella LLA

Le proprietà citogenetiche dei diversi tipi di leucemia sono importanti per la stratificazione del rischio prognostico per le leucemie sia del bambino che dell'adulto (Moorman AV, 2012). Le anomalie cromosomiche clonali sono presenti nell' 80% dei casi anche se nel 30% non viene identificato il ruolo del riarrangiamento (Dawson AJ 2011).

La maggioranza delle anomalie cromosomiche sono strutturali e generalmente si tratta di traslocazioni. Meno frequenti sono le anomalie di numero; le iperdiploidie (più di 50 cromosomi) sono presenti in circa 25% dei casi pediatrici ed hanno una prognosi relativamente buona, al contrario, la presenza di ipodiploidia (2-4% delle LLA) è associata ad una prognosi sfavorevole (Chessels JM, 1997).

Le anomalie cromosomiche strutturali sono di due tipi: qualitative e quantitative. Nelle prime il "breakpoint" avviene entro i geni coinvolti, con conseguente produzione di un trascritto di fusione funzionale e di una proteina chimerica. Le più comuni sono le traslocazioni:

- t(12;21)(p12; q22) ETV6-RUNX1
- t(1;19) (q23; p13) TCF3-PBX1,
- t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4
- t(9;22)(q34;q11) BCR-ABL1 (Greaves MF. 2003).

La t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1 (20-30% dei casi pediatrici) conferisce una buona prognosi, invece la t(9;22)(q34;q11) BCR-ABL1 (2-5% dei casi) e la t(4;11)(q21;q23) hanno una prognosi negativa (Pui CH, 2004). Il gene MLL è coinvolto in riarrangiamenti reciproci con più di venti loci (tra cui 4q21, 9p22, 19p13,1p32) presenti più comunemente nelle leucemie che si verificano entro il primo anno di vita (Bardini M., 2015).

Le lesioni qualitative predominano nelle LLA-B che sono circa l'85% delle LLA del bambino.

Nelle anomalie quantitative, errori nel riarrangiamento Ig/TCR determinano l'attivazione del proto-oncogene che regola le sequenze di Ig/TCR causando la deregolazione dell'espressione proteica. Questo tipo di errori è più frequente nelle LLA-T che rappresentano il 15% delle LLA pediatriche. Un esempio sono le delezioni del SIL-TAL1 sul cromosoma 1p32 (10-20% dei bambini). Il riarrangiamento SIL/TAL1 è un'alterazione dovuta a una delezione interstiziale di 90 kb nel locus del gene TAL1 che si fonde con una porzione non codificante in 5' del gene SIL che determina una overespressione della proteina TAL1 (D'Angiò M, 2015). Altre lesioni nelle LLA-T includono le mutazioni di Notch1 e JAK1, l'overespressione di TLX1 (HOX11), TLX3 (HOX11L2), LYL1, ed il

riarrangiamento di ABL1 (Graux C. 2006; Homminga I et al., 2012).

Utilizzando gli array genomici è evidente che, oltre alle aneuploidie e alle grosse perdite o guadagni di regioni cromosomiche rilevabili con la citogenetica convenzionale, nelle LLA sono presenti anche anomalie cromosomiche submicroscopiche. Amplificazioni e delezioni genomiche sono state osservate in regioni cromosomiche contenenti geni associati alla leucemia, tra cui 12p13.2 ETV6, 21q22.12 RUNX1, e 11q23.3 MLL (Kawamata N. et al., 2008). Sono state identificate aberrazioni nei fattori che controllano i percorsi di sviluppo delle cellule B, in quelli coinvolti nella progressione del ciclo cellulare e nei regolatori trascrizionali come per esempio, CDKN2A (9p21.3), CDKN1B (12p13.1), RB1 (13q14.2), PAX5 (9p13.2), EBF1 (5q33.3), TCF4 (18q21.2) e IKZF1 (Ikaros) (7p12.2) (Mullighan CG. 2007, Baughn LB. 2015).

Numerose pubblicazioni dimostrano che gli array genomici possono contribuire alla scoperta e la caratterizzazione di nuovi geni coinvolti nello sviluppo della LLA (Baughn LB, 2015; Homminga, 2011).

In questo studio, abbiamo valutato l'utilità dell'*array-CGH* come strumento prognostico, mettendo a confronto i suoi punti di forza e di debolezza con i dati ottenuti dalle indagini di routine. Il nostro obiettivo è stata la caratterizzazione genetica di pazienti in età pediatrica con diagnosi di LLA che attualmente rappresenta il tumore pediatrico più comune e che, nonostante la sopravvivenza oggi superi il 80% (Pui CH 2004), rimane tuttavia la causa di morte più importante di tumore nei bambini e nei giovani adulti.

1.3 La citogenetica

1.3.1 La citogenetica classica

La citogenetica convenzionale ha svolto un ruolo fondamentale nella rilevazione di riarrangiamenti cromosomici ricorrenti nelle neoplasie ematologiche, contribuendo alla diagnosi, alla prognosi e all'identificazione dei geni coinvolti. L'indagine citogenetica attualmente si avvale delle seguenti tecniche:

- citogenetica convenzionale
- ibridazione in situ fluorescente (FISH)
- ibridazione genomica comparativa (array-CGH)

La rilevazione clinica delle anomalie si basa principalmente sul cariotipo e sulla FISH, ma entrambe queste tecniche hanno delle limitazioni. Il cariotipo può non essere informativo a causa della bassa cinetica cellulare (indice mitotico), della propensione dei blasti leucemici alla apoptosi in coltura, alla crescita eccessiva delle cellule normali, alla scarsa qualità dei cromosomi nel clone anomalo. Si giunge perciò al fallimento della coltura in quasi il 20 % dei casi e a una crescita eccessiva delle cellule normali in un ulteriore 20 % dei casi (Harrison CJ 2005).

La risoluzione del bandeggio generalmente accettato per un cariotipo da sangue periferico è di 550 bande per genoma aploide, con una banda pari a circa 5-10 Mb di DNA mentre un cariotipo da midollo osseo non supera una risoluzione di soli circa

300-400 bande per genoma aploide.

1.3.2 L'Ibridazione in Situ Fluorescente

L'ibridazione *in situ* fluorescente applicata a preparati citogenetici, consente di identificare lesioni genetiche criptiche non individuabili con il cariotipo standard. Tuttavia, sebbene la FISH abbia il vantaggio di poter essere utilizzata sulle cellule in interfase, è limitata a specifici loci correlati al sospetto clinico.

1.3.3 L'array-CGH

L'utilizzo dell'*array-CGH* ha rivoluzionato la citogenetica convenzionale (Oostlander AE, 2004) e attualmente rappresenta uno strumento diagnostico complementare ai precedenti.

Il principio su cui si basa la tecnica dell'*array-CGH* è la comparazione quantitativa del DNA in esame (estratto dalle cellule fetali, dal prelievo ematico del paziente, o da cellule di tessuto tumorale) e del DNA genomico di riferimento proveniente da un soggetto sano. Tale tecnica permette di individuare amplificazioni e delezioni di segmenti di DNA. I DNA vengono marcati in maniera differenziale con molecole fluorescenti (generalmente si utilizza un fluorocromo rosso per il DNA del campione ed un fluorocromo verde per il controllo) e, successivamente, vengono mescolati in parti uguali e fatti incubare (ibridazione) su un microarray, costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA (sonde). Ognuna di queste sonde rappresenta una specifica regione del genoma umano e tanto più è elevato il loro numero e tanto più piccole sono le loro dimensioni, maggiore è l'efficacia dell'array nell'identificazione delle variazioni del numero di copie. Attraverso l'utilizzo delle piattaforme micro-array si è giunti all'individuazione di numerose zone di DNA sparse in tutto il genoma che variano per numero di copie tra gli individui: esse sono dette Copy Number Variants (CNVs). Le CNVs sono polimorfismi di lunghezza del DNA e sono costituite da segmenti di DNA con estensione maggiore o uguale a 1kb (Choy KW, 2010). Esse contribuiscono in maniera importante sia alle differenze fenotipiche degli individui che alla patogenesi di sindromi genomiche. Occorre quindi effettuare una distinzione tra CNVs patologiche e CNVs che coinvolgono loci polimorfici, da qui la grande difficoltà nell'interpretare i dati ottenuti mediante l'*array-CGH*.

I vantaggi della metodica sono:

- l'elevata risoluzione (nettamente superiore al cariotipo di routine);
- l'analisi dell'intero genoma in un unico esperimento;
- garanzia del risultato dovuta all'utilizzo del DNA.

La tecnica dell'*array-CGH* non è però in grado di identificare i riarrangiamenti cromosomici bilanciati, le poliploidie, le inversioni ed i mosaicismi a bassa percentuale.

La risoluzione dipende dalla piattaforma usata per l'ibridazione. Attualmente si usano piastre micro-array che permettono di rilevare micro aberrazioni di poche decine di migliaia di basi. L'*array-CGH* si è affermato come strumento diagnostico nella clinica per lo studio dei difetti genetici costituzionali, ma nel campo dell'oncologia è stato utilizzato fino a pochi anni fa principalmente come strumento di ricerca, per la scoperta di percorsi oncogenici nuovi e/o fattori prognostici.

Attualmente il suo supporto è richiesto per:

- caratterizzare le alterazioni genetiche presenti nei sottotipi di LLA;
- identificare la natura dell'eterogeneità clonale e come questa influenzi la resistenza al trattamento o le ricadute;
- definire il ruolo delle varianti genetiche nella suscettibilità al tumore;
- raccogliere i dati ottenuti per utilizzarli ai fini diagnostici, prognostici e farmacogenetici.

2 Materiali e metodi

2.1 Pazienti

I prelievi del sangue midollare di 19 pazienti con diagnosi di LLA sono pervenuti presso il laboratorio di Citogenetica dell'Ospedale Pediatrico Microcitemico A. Cao, inviati dal Reparto di Oncoematologia Pediatrica dello stesso Ospedale nel periodo tra il 2013 e il 2015. La casistica è rappresentata da 12 pazienti all'esordio di LLA (7 femmine e 5 maschi) trattati secondo il protocollo AIEOP –BFM ALL 2009 e 7 pazienti in I recidiva, in particolare 3 maschi con recidiva testicolare isolata, 2 femmine con recidiva midollare isolata, 2 pazienti maschi 1 con recidiva midollare e 1 con recidiva combinata midollo + testicolo trattati con protocolli di II linea (InteReALL SR 2010 e AIEOP REC 2003) (Tab 1).

L'età media dei pazienti con esordio di LLA era di circa 7 anni, con un range tra 2 e 12 anni, quella dei pazienti con recidiva era di 7,6 anni con un range tra 6 e 12 anni.

pz	sex	diagnosi	blasti %	immunofen.	geni fusione	DNA index
1	F	esordio	92	B2		0,78
2	F	esordio	62	B2		1
3	M	esordio	92	T2		1
4	M	esordio	98	B2		1
5	M	recidiva	90	B2		1
6	F	esordio	88	B2	t(12;21)mol	1
7	M	(*)recidiva t.			t(12;21)mol	
8	F	esordio	93	B2		1
9	F	recidiva	90	B2		1,94
10	F	esordio	95	B2	t(12;21)mol	1,32
11	M	(*)recidiva t.				
12	F	recidiva	65	B3		(**)N.D.
13	M	esordio	75	T3		1
14	F	esordio	90	B2	t(1;19) mol	1
15	M	esordio	88	B3	t(12;21)mol	1
16	M	(*)recidiva t.				
17	M	recidiva	88	B2		1
18	F	esordio	90	B2	t(12;21)mol	1
19	M	esordio	82	B2	t(12;21)mol	1

Tab 1. dati relativi ai pazienti esaminati

(*) Recidiva t: recidiva testicolare.

(**) N.D. nessun dato

Alla diagnosi di LLA vengono fatte le indagini che comprendono l'esame morfologico, dell'immunofenotipo, della citogenetica e della biologia molecolare con studio delle 4 traslocazioni:

- t(12;21)(p12; q22) ETV6-RUNX1
- t(1;19) (q23; p13) TCF3-PBX1,
- t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4
- t(9;22)(q34;q11) BCR-ABL1

Tutti pazienti sono stati studiati con citogenetica convenzionale e *array-CGH*. La FISH è stata eseguita per validare i risultati dell'*array-CGH* o per definire meglio riarrangiamenti cromosomici rilevati col cariotipo

2.2 Colture cellulari e citogenetica

Il sangue midollare è stato prelevato mediante puntura dalla spina iliaca postero-superiore e conservato in provetta eparinata. Per ogni campione sono state allestite 2 colture cellulari utilizzando il terreno completo Chromosome Medium M (Euroclone). La prima coltura è stata processata alle 24 h, la seconda è stata sincronizzata alle 24 h mediante il sistema Synchronet (Euroclone) e processata alle 48 ore di coltura.

Per il processo del preparato è stato utilizzato il protocollo standard fornito dalla ditta Euroclone. I preparati cromosomici sono stati analizzati utilizzando il bandeggio QFQ (con mostarda di Quinacrina) col microscopio Olympus BX 60 e il software per la cariotipizzazione automatica Power Mec 43. Sono state analizzate, quando possibile, 20 metafasi come indicato dalle linee guida.

2.3 Ibridazione In Situ Fluorescente.

La FISH è stata eseguita, utilizzando gli stessi vetrini allestiti per la citogenetica, con le sonde commerciali painting e centromeriche fornite dalla ditta Euroclone e le sonde locus specifiche fornite dalla ditta Agilent. In entrambi i casi è stata utilizzata la metodica consigliata, utilizzando il protocollo della coibridazione per la denaturazione del preparato.

2.4 Estrazione del Dna da midollo

Il DNA midollare è stato estratto utilizzando il Kit di estrazione il 5Prime PerfecPure Dna Purification distribuito dalla Ditta Eppendorf. Il Kit è stato ottimizzato per ottenere la massima purezza, stabilità e concentrazione di Dna. Si è proceduto secondo il protocollo d'uso. Il Dna è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop.

2.5 array-CGH

Per l'analisi genomica con l'aCGH sono stati utilizzati vetrini SurePrint G3 Human CGH Microarray kit 4x180K della ditta Agilent Technologies. I vetrini contengono quattro arrays ciascuno, ogni array è costituito da circa 180.000 probes.

800 ng di DNA contenuti in un volume finale di 22.2 µl sono stati digeriti e marcati utilizzando il Sure Tag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies) seguendo il protocollo (Version 7.2 July 2012). I DNA dei pazienti sono stati coniugati alla Cianina 5 (Cy5), un fluorocromo che emette fluorescenza nel campo del rosso dopo eccitazione con raggio laser, mentre i DNA di controllo (maschile e femminile) forniti dalla Agilent Technologies sono stati coniugati con la Cianina 3 (Cy3), che emette fluorescenza nel campo del verde.

Il DNA marcato è stato purificato per rimuovere l'eccesso di entrambe le cianine non incorporate che avrebbe interferito con l'esperimento incrementando il rumore di fondo. Per la purificazione sono state usate colonnine fornite con il kit di marcatura.

Il DNA marcato e purificato è stato controllato al nanodrop per determinarne la concentrazione finale e valutare l'incorporazione del fluorocromo. Poi è stata calcolata l'attività specifica per ogni campione, il cui valore deve essere compreso tra 25 e 40 (pmol/µg) per la cianina Cy3 e tra 20 e 35 (pmol/µg) per quella Cy5.

I campioni sono stati co-ibridati con il DNA genomico dello stesso sesso del paziente. L'ibridazione è stata effettuata mediante l'utilizzo del Kit Agilent oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization kit. Quantità equimolari di DNA marcato (DNA tumorale Cy5 e controparte sana Cy3) sono state combinate in un volume finale di 39 µl. Ai campioni sono stati poi aggiunti 71 µl di Hybridization Master Mix così costituita:

- 5 µl Cot-1 DNA
- 11 microl Agilent 100X Blocking Agent
- 55 µl 2X Hi-RPM Hybridization Buffer

e incubati a 95°C per 3 minuti ed a 37°C per 30 minuti. 100 µl di ogni mix sono stati messi su un vetrino coprioggetto 4x e su questo è stato adagiato il vetrino microarray

SurePrint G3. Il tutto è stato incubato in una camera di ibridazione a rotazione a 65°C per 24h.

Dopo l'ibridazione per eliminare l'eccesso di DNA non ibridato sono stati eseguiti i seguenti lavaggi:

- 5 minuti in Oligo aCGH Wash Buffer 1 in agitazione a temperatura ambiente
- 1 minuto in Oligo aCGH Wash Buffer 2 preriscaldato a 37°C.

Dopo i lavaggi, per proteggere il vetrino dalla degradazione della cianina 5, è stata posta sopra il vetrino una barriera contro l'ozono. Per la scansione dei vetrini è stato utilizzato il DNA Microarray Scanner Agilent Technologies, uno scanner a fluorescenza laser-indotta in grado di rilevare l'intensità di fluorescenza di entrambi i fluorocromi (Cy3 e Cy5) incorporati dai DNA genomici. Il risultato della scansione è stato elaborato dal software Feature Extraction nella versione 10.7 che quantifica il rapporto tra i segnali emessi dal campione e dal DNA di riferimento e indica quanto questo si discosti dai valori attesi. Se il rapporto delle intensità dei fluorofori è pari a zero la regione analizzata non presenta alterazioni. Se invece il rapporto Cy5/Cy3 è alterato si è in presenza di amplificazioni o delezioni: in caso di trisomia il rapporto sarà pari a 1,5 e cioè $3/2$ ($\log_2 3/2 = 0,5$), viceversa in caso di monosomia il rapporto sarà pari a 0,5 e cioè $1/2$ ($\log_2 1/2 = -1$).

Il software Agilent Genomic Workbench Software versione 2.7 è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati. Esso produce un QC Report che confronta i parametri ottenuti e quelli di riferimento consentendo di controllare la qualità dell'esperimento.

Il software Agilent Genomic Workbench permette di osservare graficamente i risultati con l'esatta localizzazione cromosomica delle aberrazioni e dei geni interessati. Ad ogni oligonucleotide corrisponde la posizione esatta sul genoma, è quindi possibile definire i punti di rottura dei riarrangiamenti eventualmente presenti. I parametri di analisi che utilizzati in questo studio sono i seguenti: ADM-2: 5.0, Fuzzy-zero: ON, Centralization algorithm: ON, Moving Average algorithm: *triangular*, Aberration Filter: *minimo numero di probes 3*.

Per la valutazione dei dati si è fatto riferimento al Genome Assembly hg19 e sono stati consultati il Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), il sito UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), il sito Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), il Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman) e il sito Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/>)

RISULTATI

Il lavoro descrive lo studio citogenetico/citogenetico molecolare eseguito su 19 pazienti di età pediatrica con diagnosi di LLA provenienti dal reparto di Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale Pediatrico Microcitemico A. Cao. (Tab 1). L'indagine della citogenetica classica è risultata valutabile in 11 pazienti a causa dell'assenza di metafasi, del loro numero insufficiente o della scarsa qualità delle metafasi presenti. Si è riscontrato un cariotipo normale ad esclusione dei casi 8, 9 e 12 (Tab 2).





pz	Cariotipo
1	N. V.
2	46,XX
3	N. V.
4	N. V.
5	46,XY
6	46,XX
7	46,XY
8	Riarrangiamenti chr 8,9,19
9	46,XX[16]/47XX+20[2]
10	N. V.
11	46,XY
12	49,XXX,+5,+21,der(17)add(17)(p13)
13	46,XY
14	N. V.
15	N. V.
16	46,XY
17	N. V.
18	46,XX
19	N. V.

Tab. 2: cariotipo dei 19 pazienti studiati
N. V.: Non Valutabile

L'indagine citogenetica molecolare è riassunta nelle tabelle 3 (pazienti con esordio di LLA B e LLA T) e 4 (pazienti con recidiva di LLA).

Pz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
1						q12-q27				q25.2- q26.3															
2	q42.12- q44			p16.3- p16.1/q13.1-q28		q11.1-q12			p24.3-p13.2/ q21.2				q11- q12.3			p12- p11.2							q21.2-q28		
3									p24.3- p23/p21.3				q33.2- q34												
4			p22.2						p24.3-p13.2								q12			q11.21- q13.33					
6		2q24.1					q21.1		p13.2			p13.2									q22.12- q22.3	q11.2			
8									p24.3-p13.1/ q21.11-q34.3																
10	p36.23- q21.3																								
13	1p38								p21.3	q23.31															
14	q23.3- q44																								
15																									
18																									
19		p23.3-p22.2/ p21/q36.3-q37.1				q14.1- q22.33		p23.3-p21.2/ q12.3-q24.3	p22.2/p21.3- p21.1			p13.2- p13.1					q21.2				q11.2- q22.3	q11.22	p22.33/ q21.1-q27	p11.32-p11.2/ q11.21-q11.23	

Tab 3: risultati dell'array CGH nei pazienti con esordio di LLA B e LLA T

LEGENDA	
	delezioni
	uplicazioni
	delezione intero cromosoma
	amplificazioni e intero cromosoma

CP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
5	q41-q44								p21.3				q14.11										q22.2-q28	q12
7																								
9	q42.13-q44		q24		q16.2				q34.11	p15.3-p12.1		q24.11-q24.12									q11.2-q22.3			
11																								
12															q11.1-q13.3		p13.3-p11.2/ q11.1-q25.3				q21.2-q22.3			
16																								
17	q21.1-q32.1						p12.1		q33.3							q11.2-q22.1/ q22.1-q24.3			q12-q13.33	q21.1-q22.3			p22.33 del e dup	p11.32/ p11.32-p11.2

Tab.4 : risultati dell'array CGH nei pazienti con recidiva di LLA

LEGENDA	
	duplicazioni
	delezioni
	amplificazione intero cromosoma

Nella tabella 3 i pazienti 1 e 10 presentano delezioni e/o amplificazioni di interi cromosomi o di ampie regioni. In entrambi i casi non si ha un confronto citogenetico. In particolare nel paziente 1 erano presenti le delezioni dei cromosomi 2, 3, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17, X, una delezione parziale sul braccio lungo del cromosoma 6(q12-q27) e l'amplificazione di parte del braccio lungo del cromosoma 10(q25.2-q26.3) (Fig 1).

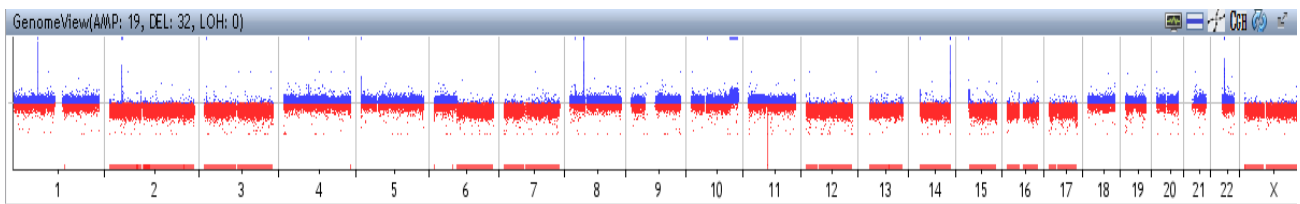


Fig 1: risultato dell'*array-CGH* sul paziente 1

La Fig 2 mostra come il paziente 10 presenti interamente deleti i cromosomi 2,7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 22, una delezione parziale sul braccio lungo del cromosoma 1(p36.33-p11.2; q21.1; q21.3) e l'amplificazioni dei cromosomi 10, 14, 21.

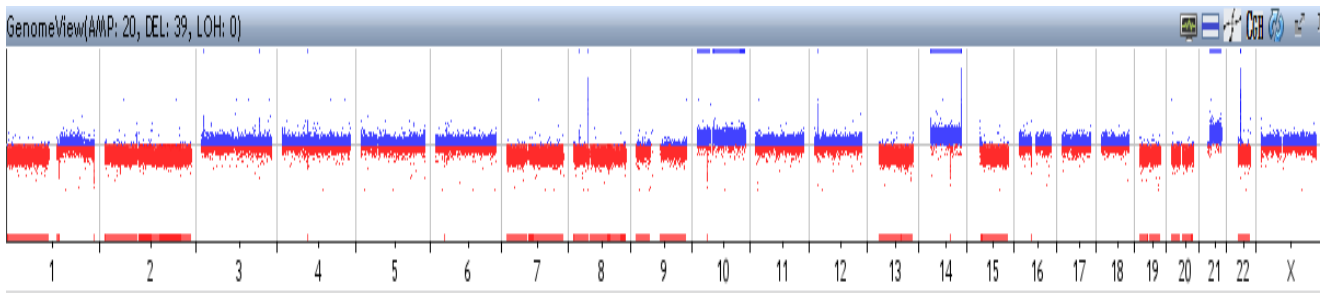


Fig 2: risultato dell'*array-CGH* sul paziente 10

t(12;21)

Il referto della biologia molecolare nei pazienti 6, 7, 10, 15, 18 e 19 indicava la presenza del gene di fusione ETV6-RUNX1 derivante dalla t(12;21)(p12;q22).

I pazienti 6, 10, 15, 18 e 19 erano esordi di LLA pB mentre il paziente 7 era una recidiva combinata testicolo più midollo.

Solo tre pazienti (6, 7 e 18) avevano il risultato della citogenetica convenzionale che non evidenziava riarrangiamenti.

L'analisi con l'array CGH è risultata normale nel paziente 7.

Nei pazienti 6 e 19 è emersa la delezione nella regione 12p13.2 che comprende una piccola delezione al 3' del gene ETV6.

I pazienti 6, 10, 18 e 19 avevano un'amplificazione di dimensione variabile del cromosoma 21. Presente anche nei pazienti con recidiva midollare 9, 12 e 17 (Fig 3)

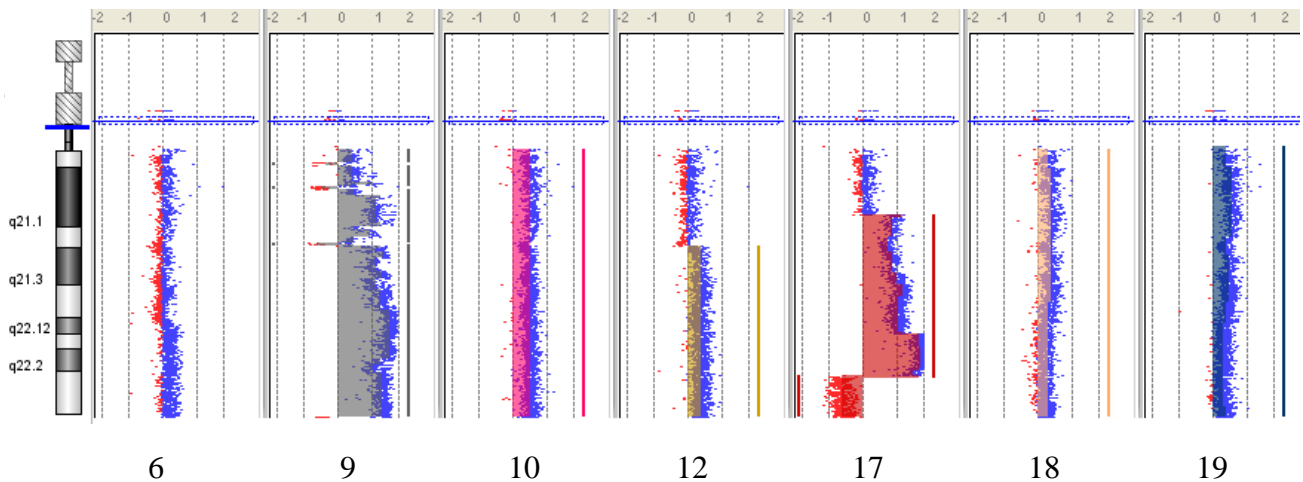


Fig 3: risultati dell'*array-CGH* sul cromosoma 21

Le regioni sul cromosoma 21 amplificate erano molto estese e comprendevano sempre l'oncogene RUNX1 (21q22.12) che codifica per un fattore di trascrizione e riveste un ruolo di primo piano nello sviluppo della emopoiesi. L'amplificazione cromosomica di tale regione è stata confermata con la FISH su nuclei in interfase utilizzando la sonda specifica per tale gene.

Le figure 4 e 5 mostrano l'ibridazione in situ eseguita con le sonde centromeriche dei cromosomi 13/21. Il numero in eccesso di segnali è dato dall'amplificazione del cromosoma 21.

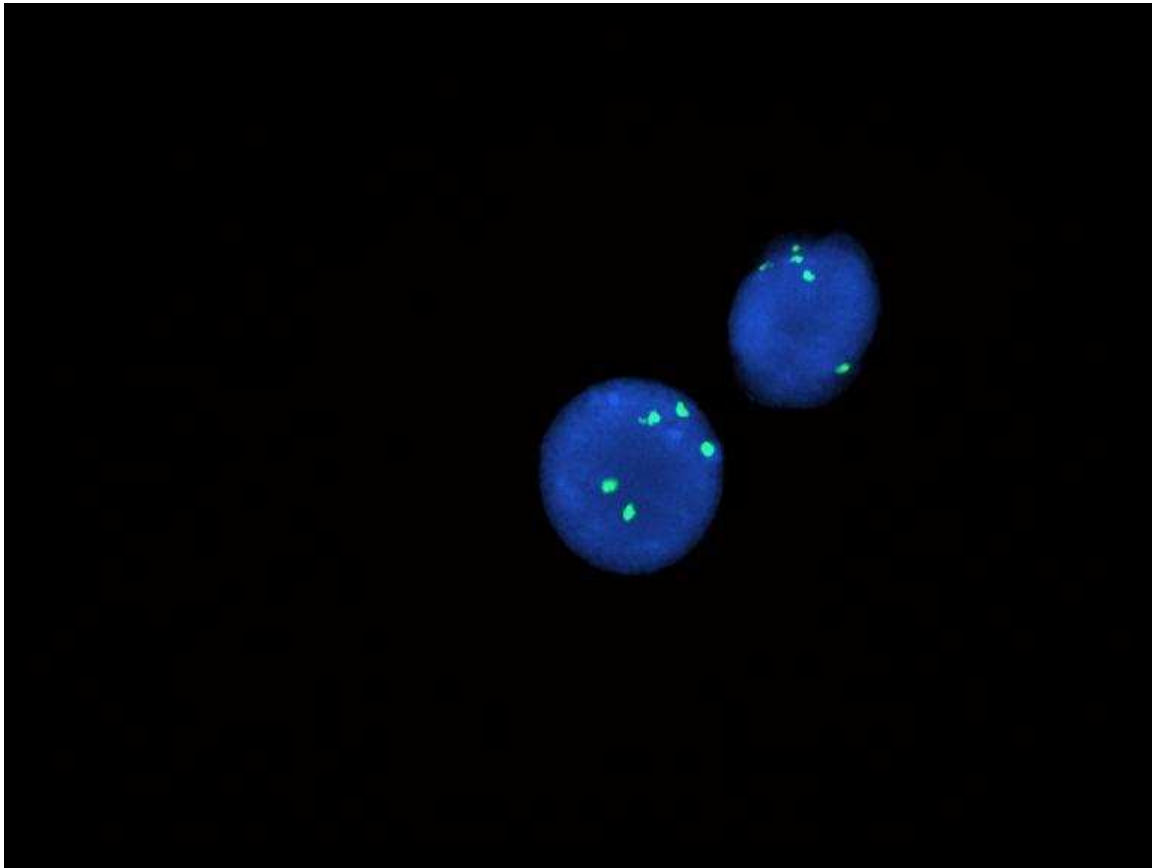


Fig 4: FISH sonde alfoidi chr 13/21 pz 9 Presenza di 3 segnali del chr 21

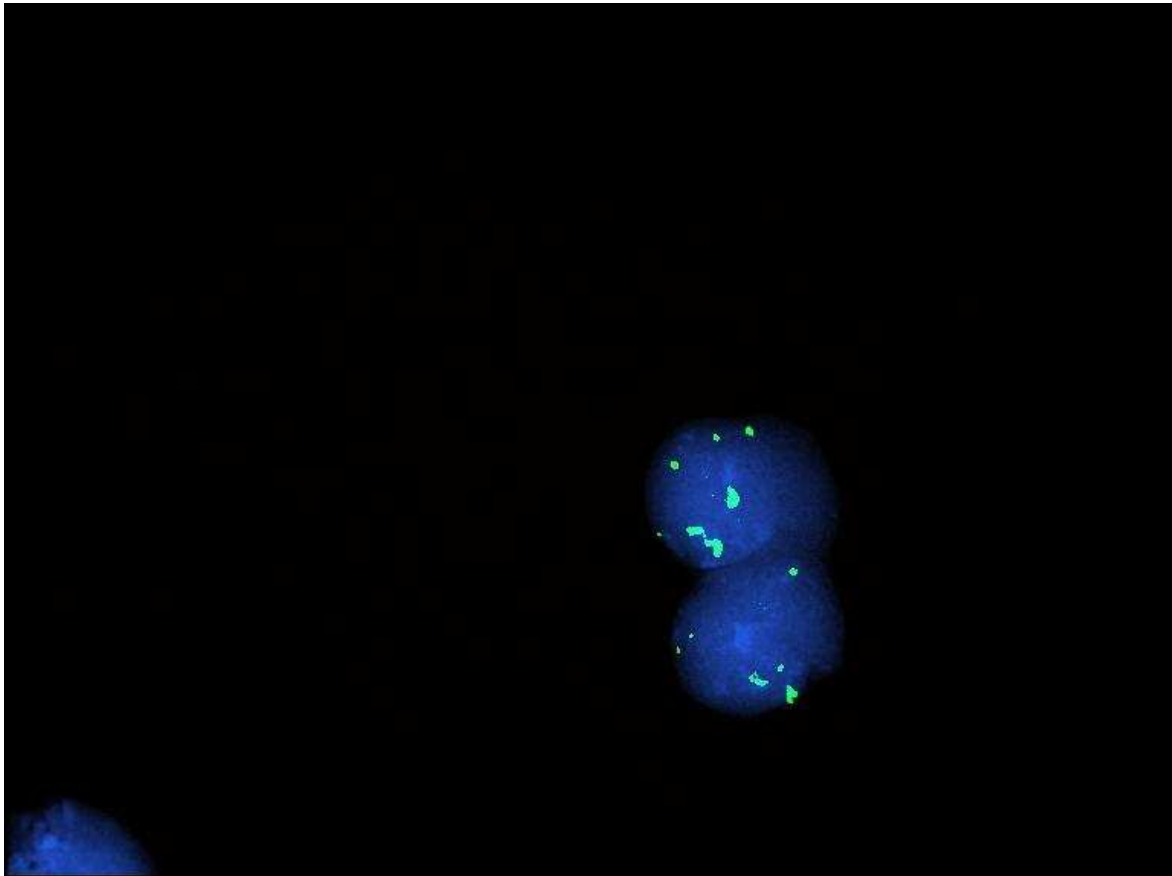


Fig. 5: FISH sonde alfoidi chr 13/21 pz 10 Presenza di 4 segnali del chr 21

I pazienti 6, 10, 18 e 19, presentavano parallelamente anche una delezione di dimensioni variabile sul cromosoma 22, causa di parziale o totale delezione del gene VPREB1, che codifica una proteina appartenente alla famiglia delle immunoglobuline ed è espresso selettivamente nelle prime fasi di sviluppo delle cellule B (fig 6).

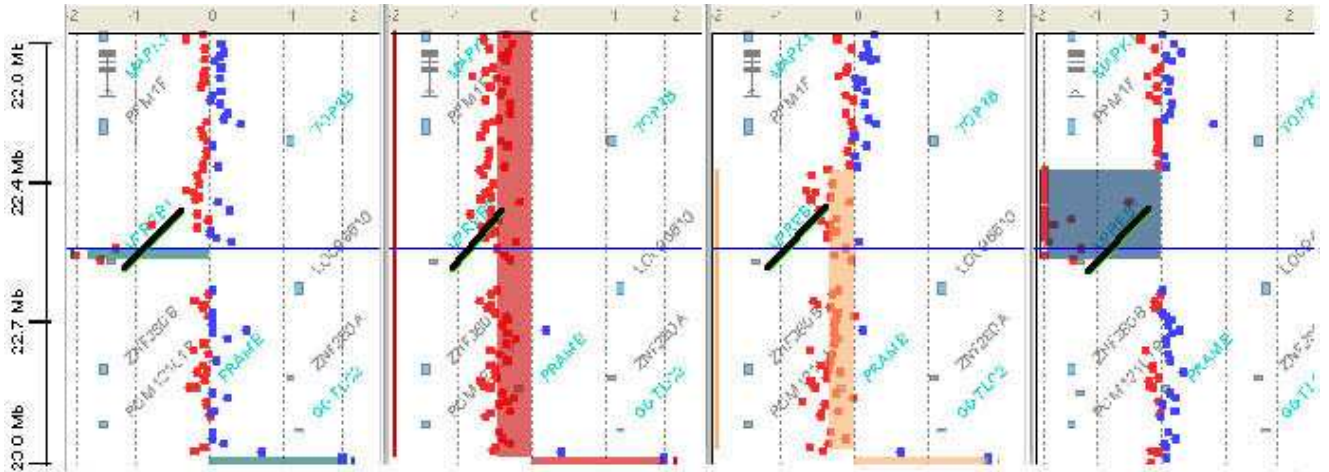


Fig 6: delezioni del gene VPREB1 nei pazienti 6, 10, 18 e 19.

t(1;19)

Nel paziente 14, anch'esso un esordio di LLA pB, era presente il gene di fusione E2A/PBX1 dato dalla presenza della t(1;19)(q23;p13).

Tale traslocazione può essere presente in forma bilanciata o sbilanciata. Nel nostro caso, nel quale mancava il dato della citogenetica classica, l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza del derivativo del cromosoma 19, der(19) t(1;19)(q23;p13). (Fig 7 e 8).

Non sono stati evidenziati sbilanciamenti in altri cromosomi.

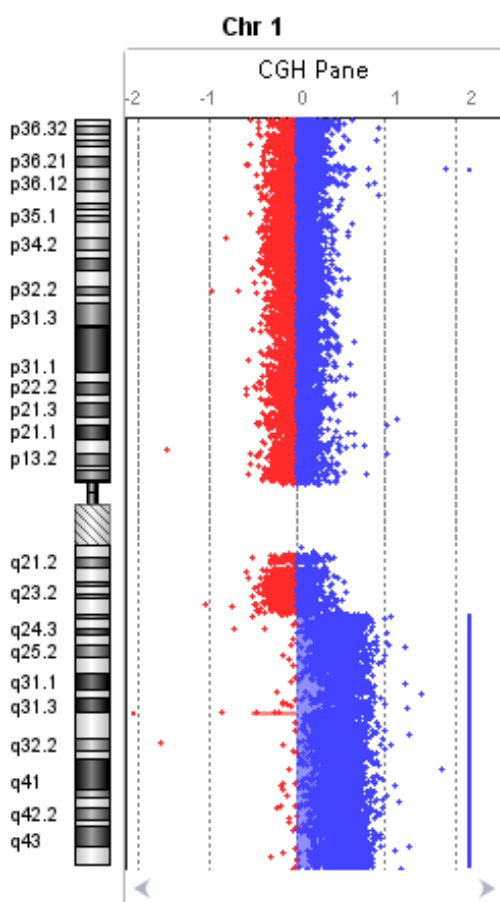


Fig 7: risultato dell'array sul chr 1, amplificazione 1q23.3-q44

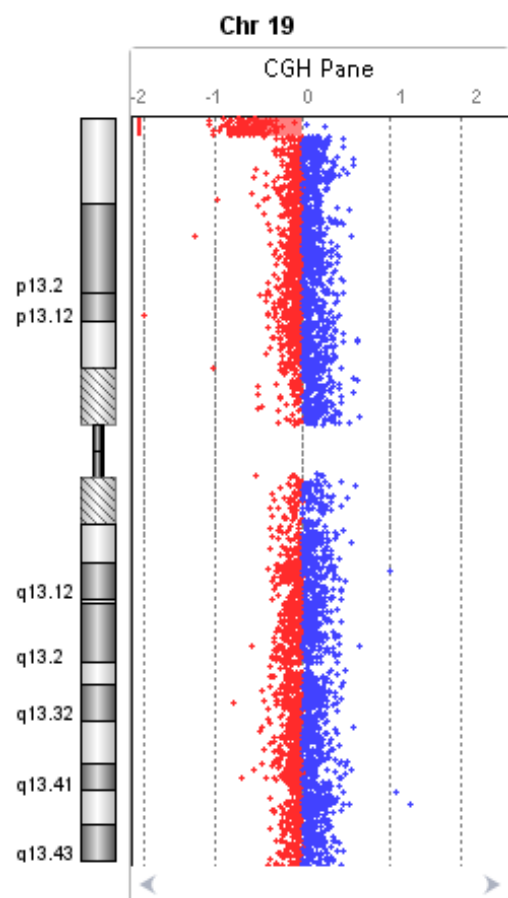


Fig 8: risultato dell'array sul chr: 19: delezione del chr 19p13.3

cromosoma 9p

Un elemento in comune ad 11 dei 19 pazienti esaminati, sia quelli con esordio di leucemie B e T che quelli con recidiva midollare era la presenza di riarrangiamenti sul cromosoma 9. Particolare attenzione meritano le delezioni presenti sul braccio 9p, in letteratura descritto come un hot spot preferenziale nelle LLA infatti contiene numerosi geni associati alle neoplasie.

L'estensione delle delezioni sul 9p è risultata variabile, interessando tutto il braccio corto o solo piccole regioni (Fig 9).

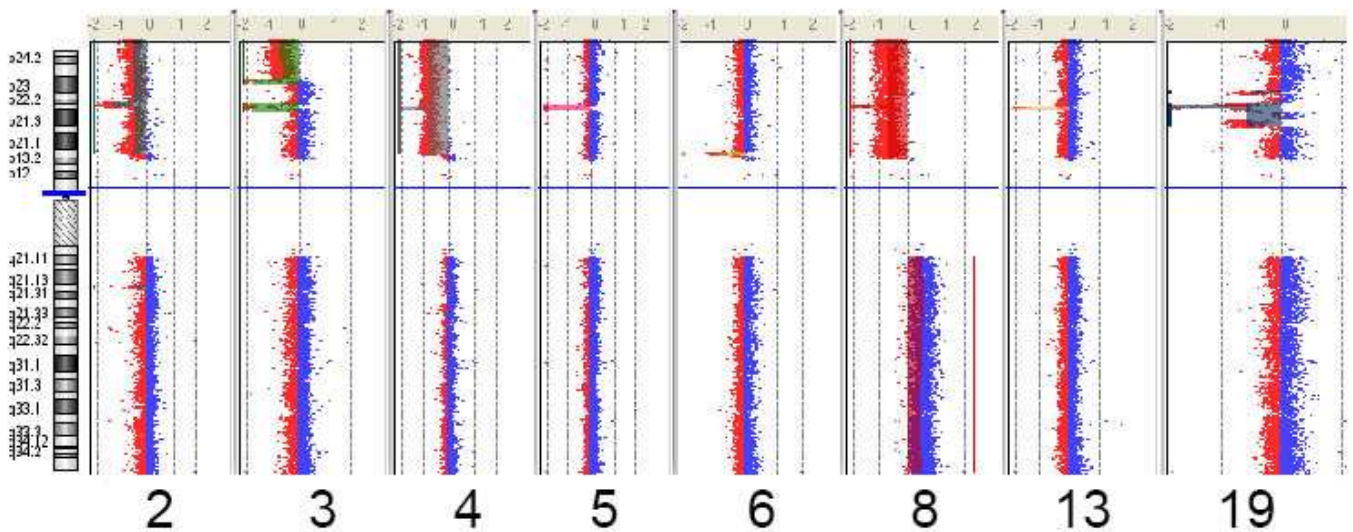





Fig 9: risultati dell'*array-CGH* del cromosoma 9

Ciascuna delezione comprendeva a seconda dell'estensione e della localizzazione i geni JAK2 (9p24.1), MLLT3, IFN, MTAP, CDKN2A e CDKN2B (9p21.3), PAX5 e MELK (9p13.2). Alcuni geni compresi in questa regione erano deleti in omozigosi. (Tab. 5).

pz	delezione chr 9p	start -stop	size (bp)	geni deleti
2	del 9(p24.3-p13.2)	204,193-36,992,764	36,788,751	JAK2, MLLT3, IFN, MTAP, CDKN2A, CDKN2B, PAX5, MELK
3	del 9(p24.1-p23), del 9p21.3	20,4193-13,974,099---211,40864-22487417	13,769,907--1,346,554	JAK2, MLLT3, IFN, MTAP, CDKN2A, CDKN2B,
4	del 9(p24.3-p13.2)	204,193-37,354,879	37,150,687	JAK2, MLLT3 MTAP, CDKN2A, CDKN2B, PAX5, MELK
5	del 9p21.3	21,331,182-22,899,643	1,568,462	IFN, MTAP, CDKN2A, CDKN2B
6	del 9p13.2	36,419,434-37,441,387	1,021,954	PAX5, MELK
8	del 9(p24.3-p13.1)	<i>tutto il braccio corto</i>		JAK2, MLLT3, IFN, MTAP, CDKN2A, CDKN2B, PAX5, MELK
10	<i>tutto il cromosoma</i>	<i>tutto il cromosoma</i>		JAK2, MLLT3, IFN, MTAP, CDKN2A, CDKN2B, PAX5, MELK
13	del 9(p21.3)	21,805,270-22,176,231	370,962	MTAP, CDKN2A, CDKN2B
19	del 9(p22.2) del 9(p21.3-p21.1)	16,786,118-17,630,931—20,694,462-28,562,040	844.814---7,867,579	IFN, MTAP, CDKN2A, CDKN2B

Tab 5: delezioni sul braccio corto chr 9

LEGENDA	
	gene deleto nella regione 9p24.1
	geni deleti nella regione 9p21.3
	geni deleti nella regione 9p13.2
<i>In grassetto sono indicati i geni deleti in omozigosi</i>	

Cromosoma 1

Il cromosoma 1, così come il cromosoma 9, presenta numerosi riarrangiamenti. Nei pazienti 2, 5, 9, 10 e 17 erano presenti delezioni e duplicazioni principalmente sul braccio lungo (Fig 10) in regioni che comprendono anche geni coinvolti nella oncogenesi come RAB4A e MLLT11.

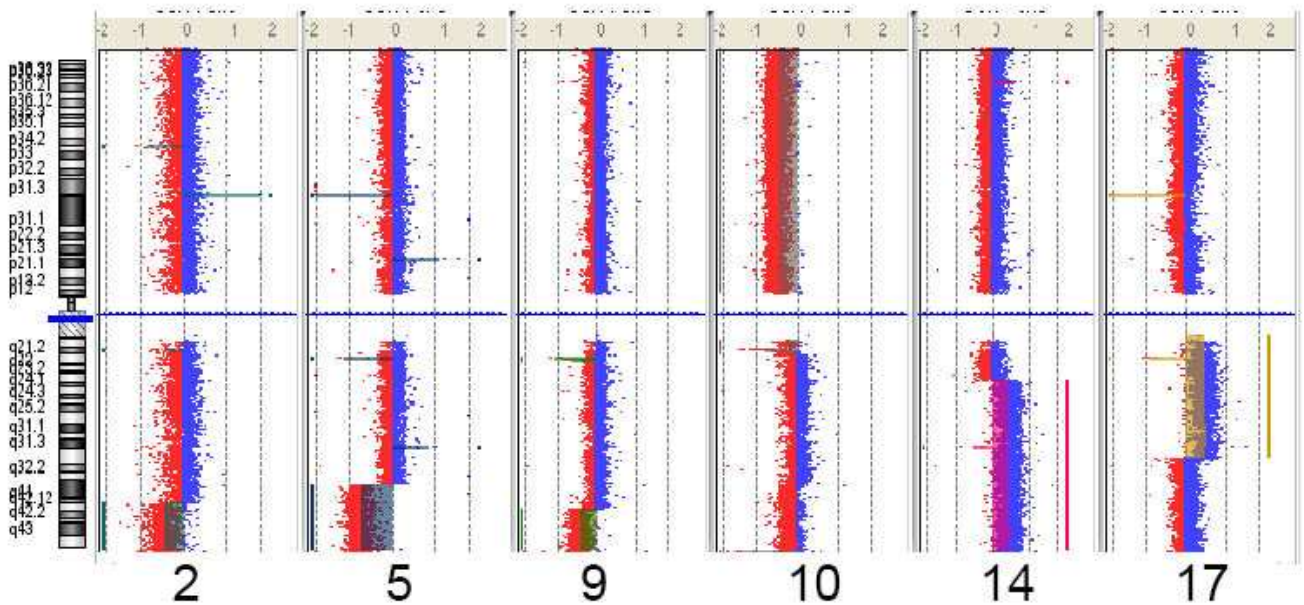


Fig 10: risultati dell'array-CGH sul cromosoma 1

Nel paziente 13 con esordio di LLA T era presente una delezione di parte del gene STIL (76,281 bp) sul braccio corto del cromosoma 1p33 possibile conseguenza della traslocazione interstiziale SCL/TAL1 con formazione del gene di fusione. Il dato ottenuto è in attesa di conferma con la biologia molecolare.

Regione PAR1

In due pazienti (17 e 19) è stata identificata mediante l'analisi con l'array-CGH una delezione della regione pseudoautosomica dei cromosomi Xp22.3 e Yp11.3 (Fig 11, 12, 13 e 14). La delezione a livello della regione PAR1 nei cromosomi X/Y coinvolge il gene CRLF2.

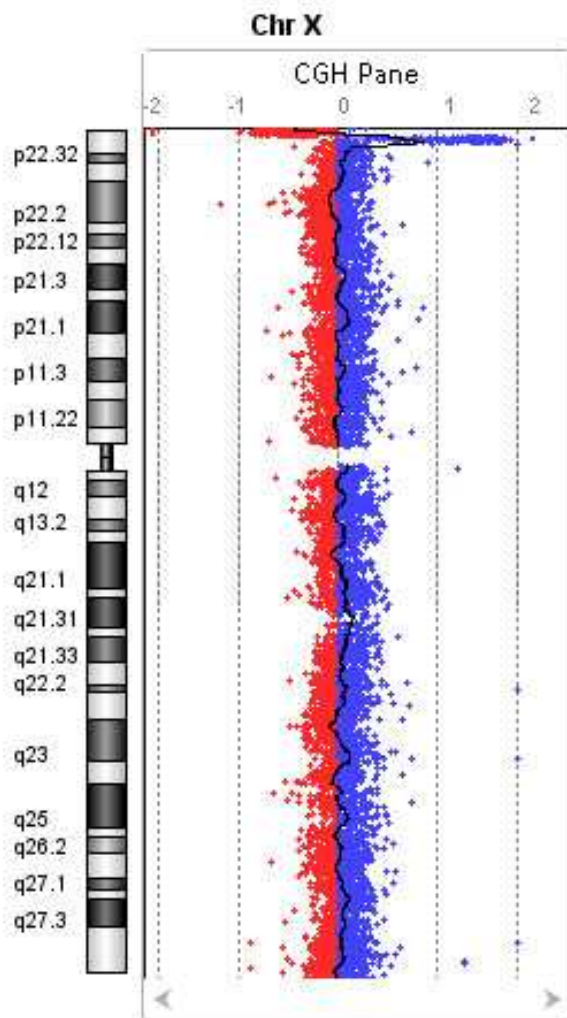


Fig 11: del Xp22.3 pz 17

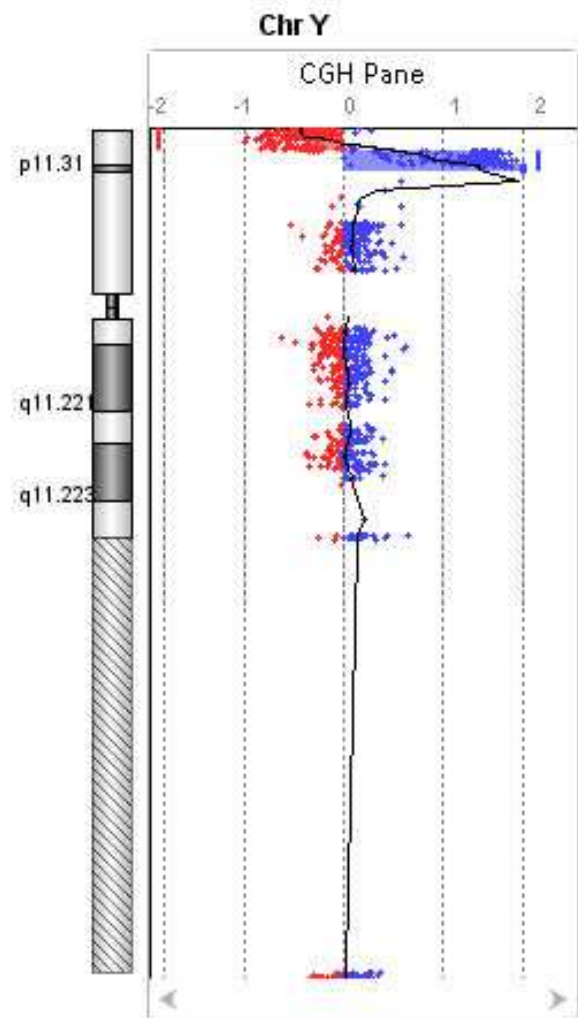


Fig 12: del Yp11.3 pz 17

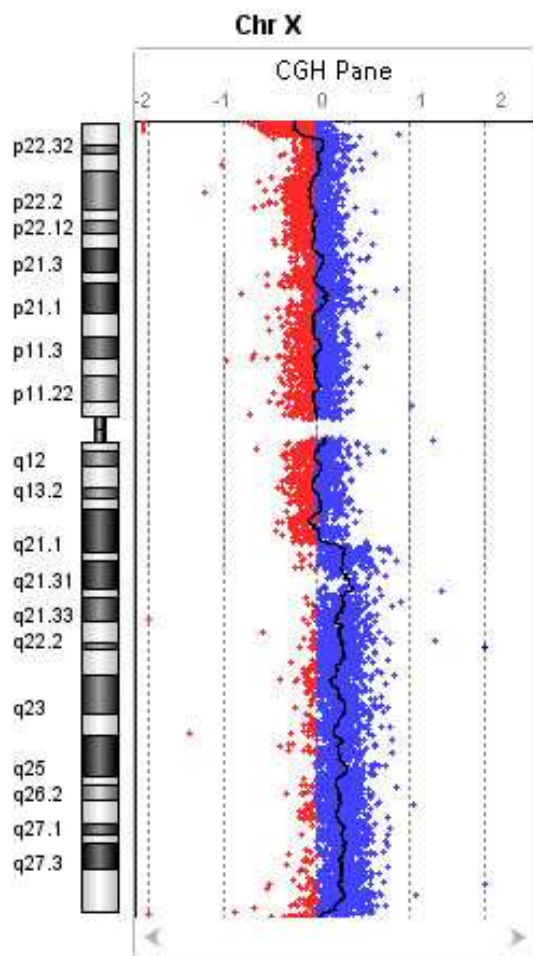


Fig 13: del Xp22.3 pz 19

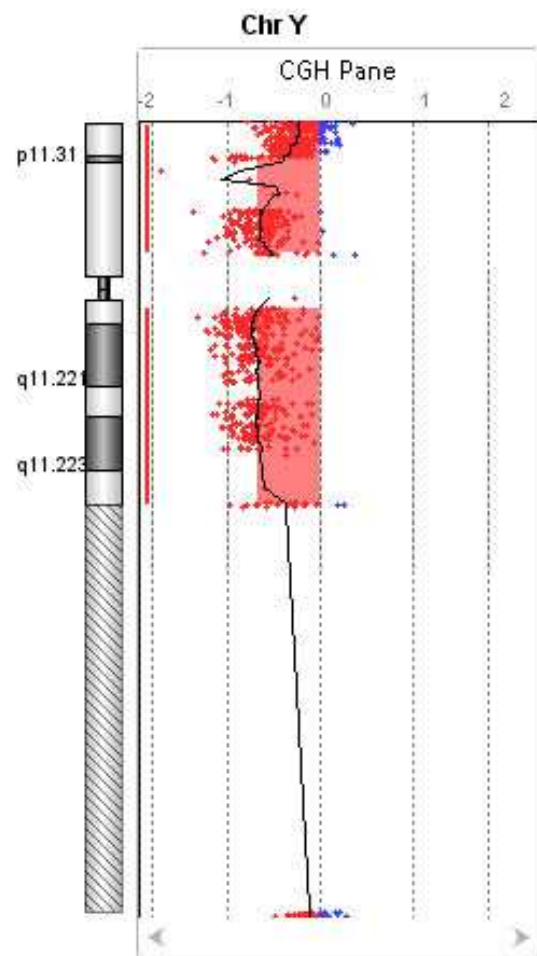


Fig 14: delY(p11.32- p11.2) pz 19

Riarrangiamenti di piccole dimensioni

L'analisi con l'*array-CGH* ha consentito di evidenziare anche alterazioni di piccole dimensioni che coinvolgono geni importanti nelle LLA:

- la delezione di 51 bp sul gene PTEN (gene oncosoppressore) sul cromosoma 10q23.31 (paziente 13)
- delezione di 247,234 bp del gene FHIT (implicato nel ciclo cellulare) sul cromosoma 3p14.2 (paziente 6)
- delezione di 31,738 bp del gene IKZF1 (regolatore della differenziazione dei linfociti) sul cromosoma 7p12.1 (paziente 17).

Citogenetica e analisi molecolare

Il confronto dei dati citogenetici con i dati molecolari è stato possibile nei pazienti 8, 9, 12 ed in particolare

- Caso 8: il cariotipo ha evidenziato riarrangiamenti coinvolgenti i cromosomi 8, 9 e 19 (Fig 15), La FISH, eseguita utilizzando le sonde painting dei cromosomi 8 e 9, ha evidenziato un der 9 t(8;9) (fig 16) e l'ibridazione con la sonda painting del cromosoma 19 ha mostrato un segnale in un cromosoma 19 di dimensioni più piccole del normale (fig 17)

Con l'*array-CGH* non sono emersi sbilanciamenti sul cromosoma 8 mentre il cromosoma 9 era deleto per quasi tutta la lunghezza del braccio corto e duplicato su quasi tutto il braccio lungo. Il cromosoma 19 è risultato parzialmente deleto su entrambi i bracci.

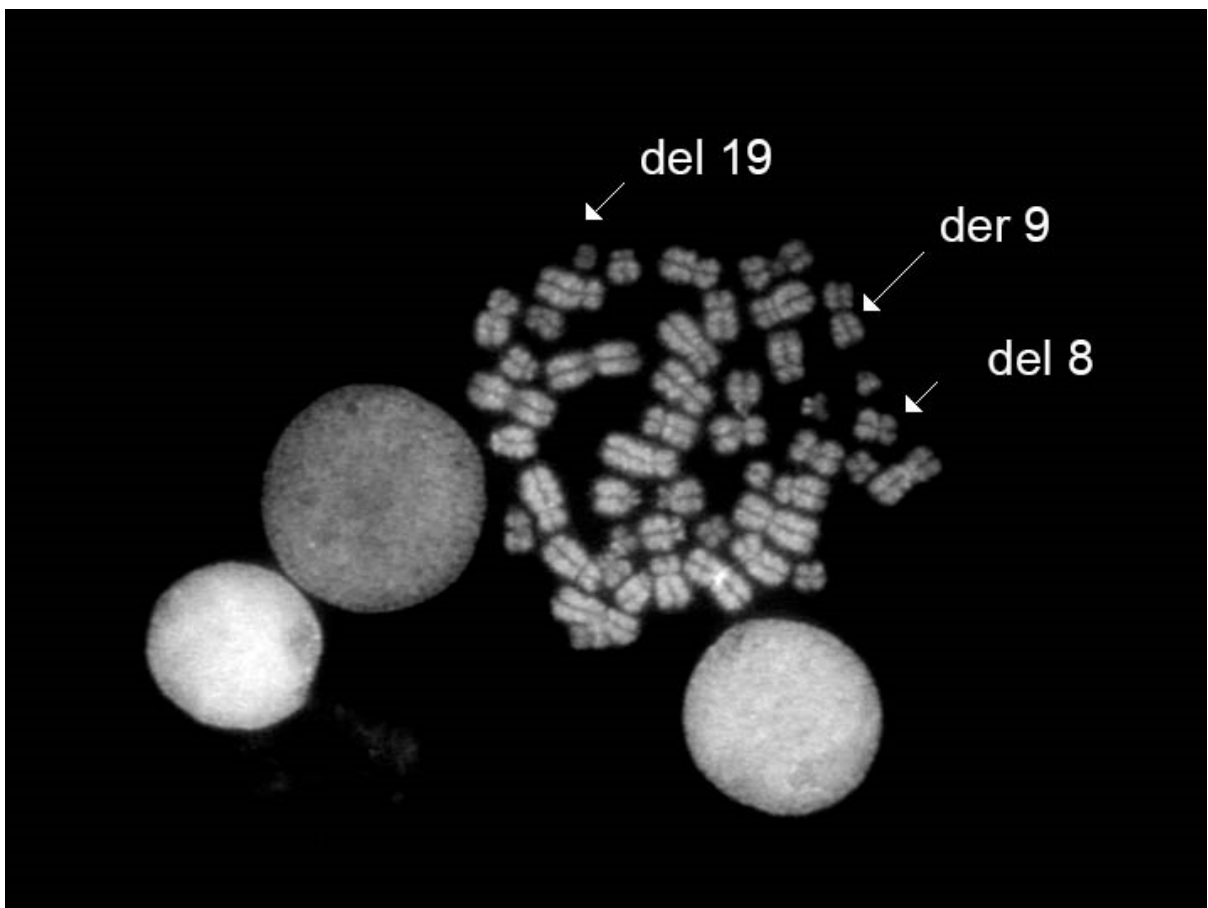


Fig 15: metafase in bandeggio QFQ paziente 8

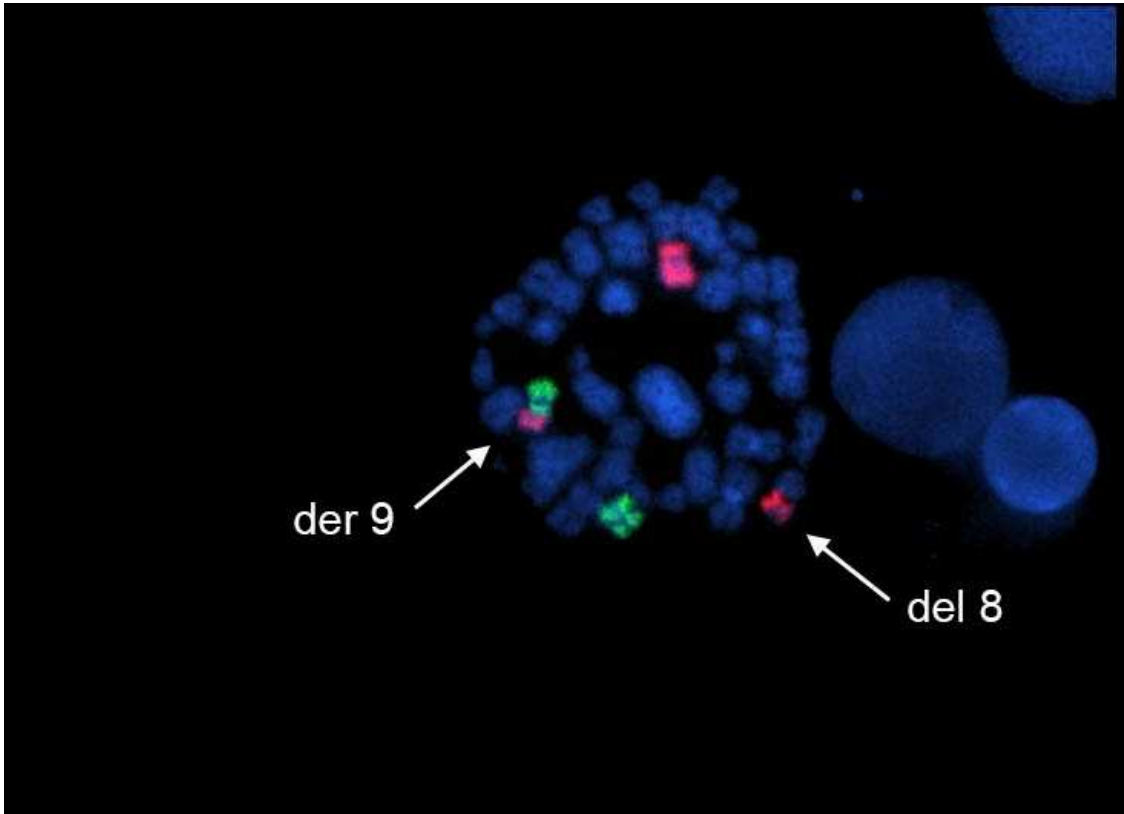


Fig 16: Fish con sonde painting red chr 8, green chr 9 paziente 8

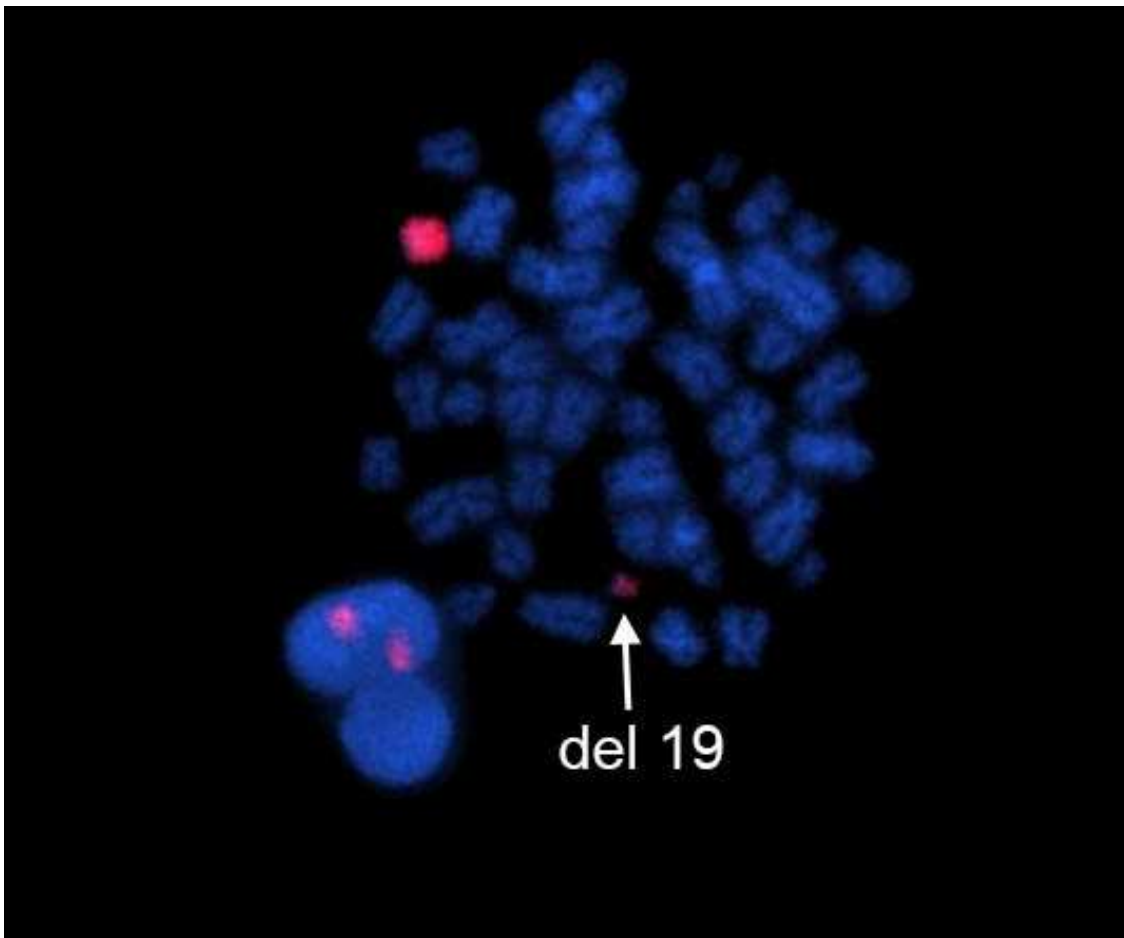


Fig 17: Fish sonda painting red chr 19 paziente 8

- nel paziente 9 il cariotipo presentava due linee cellulari: una linea con cariotipo normale e una, poco rappresentata, con presenza di trisomia del cromosoma 20. Con l'array-CGH sono emerse delezioni di parti dei cromosomi 1, 4, 6, 9, 12 e amplificazioni di tratti dei cromosomi 10 e 21 (Fig. 18)
Non si conferma la trisomia del cromosoma 20 presente con un mosaicismo troppo basso per essere rilevato con gli array.

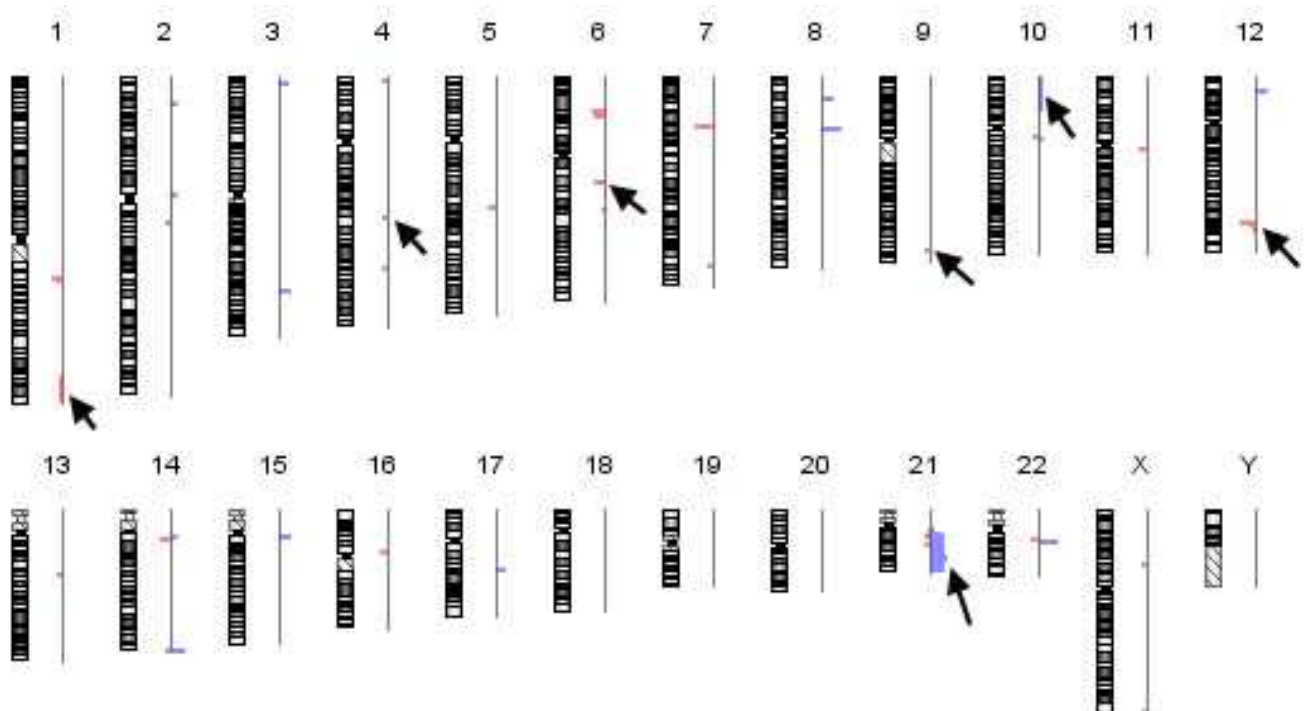


Fig 18: risultati dell'array CGH nel paziente 9, le frecce indicano le delezioni e le amplificazioni significative.

- il paziente 12 presentava un cariotipo iperdiploide con 49 cromosomi con trisomia dei cromosomi X, 5, 21 e riarrangiamento sul braccio corto del cromosoma 17 in tutte le metafasi esaminate. L'analisi molecolare confermava la trisomia dei cromosomi 5 e X. di parte del cromosoma 21. Il cromosoma 17 aveva la delezione di parte del braccio corto e la formazione di un riarrangiamento costituito dalla duplicazione della restante parte di braccio corto e del braccio lungo. Si è evidenziata inoltre l'amplificazione della regione del cromosoma 15q11.1-q13.1 (Fig 19).

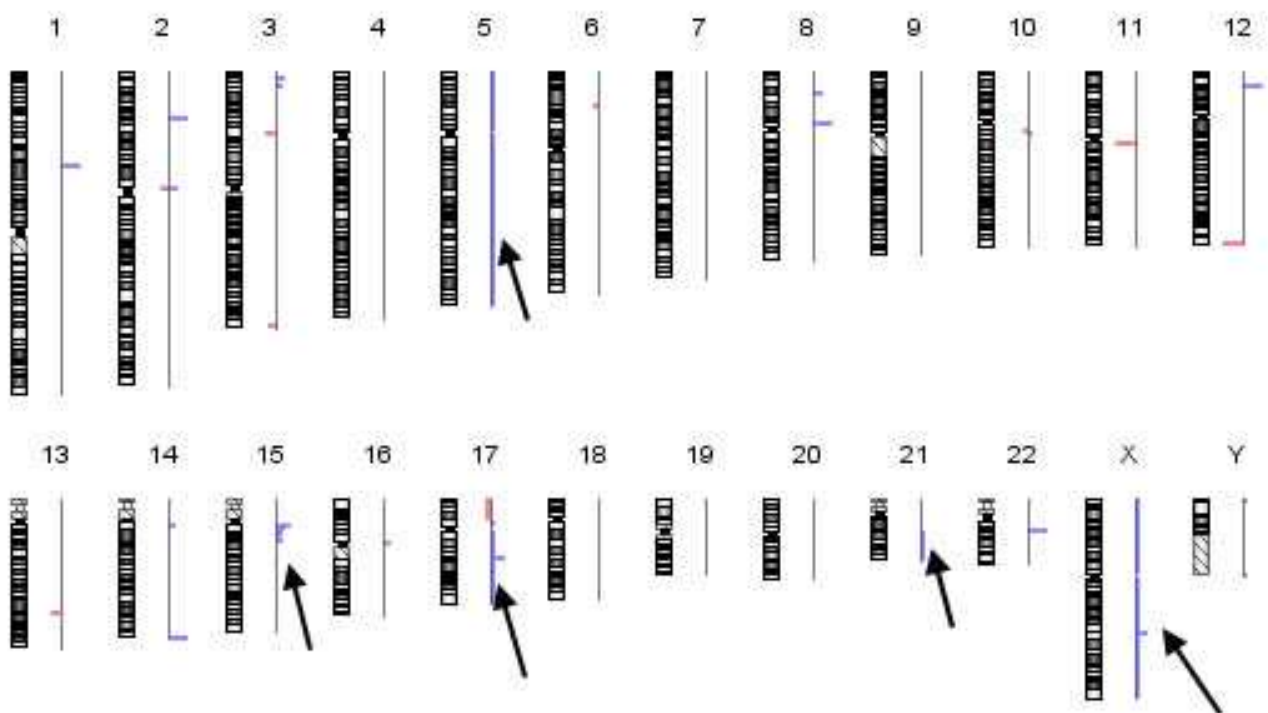


Fig19: risultati array CGH nel paziente 12, le frecce indicano le delezioni e le amplificazioni significative.

Pazienti con recidiva testicolare

Nei pazienti 11 e 16 con recidiva testicolare e cariotipo normale l'analisi molecolare ha confermato l'estraneità del midollo alla recidiva

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni l'introduzione della tecnica di citogenetica molecolare *array-CGH* ha consentito, anche nella diagnostica delle neoplasie, di acquisire informazioni importanti per una definizione degli sbilanciamenti genomici presenti in regioni già descritte o consentendo di identificarne delle nuove.

In questo studio sono stati analizzati con *array-CGH* 19 pazienti in età pediatrica affetti da leucemia linfoblastica acuta all'esordio o in prima recidiva e tale metodica è stata un valido supporto per identificare anomalie genomiche non evidenziabili con la citogenetica classica o con altre tecniche di biologia molecolare.

L'indagine molecolare sui 12 casi all'esordio (10 pazienti con LLA pB e 2 con LLA T) ha evidenziato la presenza di numerosi riarrangiamenti.

Nei pazienti 1 e 10 sono emerse delezioni e amplificazioni di interi cromosomi.

Nel paziente 1 il DNA index inferiore ad 1 è stato confermato dal dato ottenuto con l'*array-CGH* indicando una ipodiploidia. L'ipodiploidia, utilizzata come criterio di stratificazione dal protocollo AIEOP BFM ALL 2009, ha determinato l'eleggibilità della paziente alla fascia di alto rischio.

Nel paziente 10 il risultato ottenuto con l'indagine molecolare, con una prevalenza di delezioni rispetto alle amplificazioni, probabilmente risultava mascherato poichè il valore del DNA index di 1,32 indica viceversa che il numero delle regioni amplificate superava quello delle delete. Il limite della metodica impedisce infatti la valutazione quantitativa delle regioni amplificate.

In 5 pazienti (6, 10, 15, 18 e 19) l'indagine molecolare evidenziava la presenza del gene di fusione ETV6-RUNX1 derivato dalla t(12;21) che conferiva una prognosi favorevole (Papaemmanuil E, 2014). In questi pazienti l'analisi con l'*array-CGH* ha consentito di identificare una delezione parziale del gene ETV6 (nei pazienti 6 e 19) e l'amplificazione di parte o di tutto il cromosoma 21 (nei pazienti 6, 10, 18 e 19), con presenza del gene RUNX1 in massimo 4 copie confermata tramite FISH. La mancanza di dati citogenetici non ha consentito di stabilire se tale amplificazione fosse associata ad un riarrangiamento localizzato sul braccio corto o lungo del cromosoma 21. Studi di microarray e FISH hanno mostrato che tale regione è ampia e complessa. L'amplificazione intracromosomica con il gene RUNX1 presente in 3 o più copie addizionali ha una frequenza di circa il 2% delle LLA pB ed è spesso associata a prognosi sfavorevole (Rand V., 2011, Heerema NA, 2013).

I pazienti con l'amplificazione del cromosoma 21 presentavano anche la delezione parziale o totale del gene VPREB1 sul cromosoma 22. La proteina codificata da questo gene appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline ed è espressa selettivamente nelle prime fasi di sviluppo delle cellule B. L'associazione dei due riarrangiamenti è descritta in letteratura (Mangum DS, 2014).

Nella nostra coorte di pazienti la regione cromosomica più frequentemente riarrangiata con delezioni di dimensioni variabili è risultata la 9p. In nove pazienti (2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13 e 19) infatti il braccio corto del cromosoma 9 mostrava

riarrangiamenti già descritti in letteratura che coinvolgono geni importanti nel “pathway” delle LLA-B (Sarhadi VK. 2013, Iacobucci I., 2010).

In 5 pazienti (2, 4, 6, 8 e 10) la delezione in 9p13.2 comprendeva il gene PAX5, frequentemente coinvolto nelle LLA del bambino e fattore di trascrizione per lo sviluppo e il differenziamento delle cellule B e il gene MELK, che codifica per una tirosin-chinasi, ligando specifico di NIPP1 (Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1), che interviene nell’assemblaggio dello spliceosoma.

Il gene CDKN2A, localizzato in 9p21.3, che codifica per trascritti che mediano la transizione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, era deleta nei pazienti 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13 e 19. La delezione era sempre associata a quella dei geni CDKN2B e MTAP, contigui a CDKN2A, anch’essi codificanti per fattori di controllo del ciclo cellulare.

Il gene JAK2, localizzato nella regione 9p24.1 e codificante per una tirosin-chinasi citoplasmatica che interviene nella trasduzione del segnale di molteplici fattori di crescita, era deleta nei pazienti 2, 3, 4, 8 e 10.

Da sottolineare che solo nel paziente 8 il cariotipo e la FISH erano informativi e hanno consentito una migliore definizione del riarrangiamento del cromosoma 9.

La nostra analisi molecolare ha anche consentito di individuare in 2 casi (paziente 17 LLA recidiva e paziente 19 LLA pB all’esordio) la delezione della regione pseudoautosomica PAR1 presente sul cromosoma X/Y (Xp22.33 e Yp11.32), coinvolgente il gene CRLF2 recettore della linfopoietina timica stromale.

La delezione di questa regione fa parte di un gruppo di alterazioni presenti nell’8% circa dei pazienti pediatrici con leucemia linfoblastica acuta a precursori B e determina una overespressione del gene CRLF2 (Russell LJ, 2009).

Nel cromosoma 1 l’analisi con l’array CGH ha evidenziato in 6 pazienti (casi 2, 5, 9, 10, 14 e 17) delezioni o amplificazioni principalmente sul braccio lungo di dimensioni dalle 21 Mb a 59,9 Mb. I riarrangiamenti su tale cromosoma non appartengono al gruppo di riarrangiamenti comunemente descritti nei casi di LLA pediatrica. Nel paziente 14 era presente la t(1;19) in forma sbilanciata.

Sono da tenere in considerazione poiché coinvolgono geni correlati alla leucemia la delezione parziale del gene IKZF1 in 7p12.1 (paziente 17), e quelle dei geni STIL in 1p33 e PTEN in 10q23.31 (paziente 13), e del gene FHIT sul cromosoma 3p14.2 (paziente 6) anche se sono riarrangiamenti di piccole dimensioni (32 bp, 76 bp, 51 bp e 247 bp rispettivamente).

Nei pazienti con recidiva midollare i risultati ottenuti non sono facilmente valutabili in quanto dovrebbero essere comparati a quelli eventualmente presenti all’esordio della malattia non in nostro possesso.

E’ stato descritto infatti che nella maggior parte dei casi di recidiva si sono avute delle modifiche sostanziali nella natura delle alterazioni genetiche durante il corso della malattia e che la ricaduta spesso nasce da un clone minore con alterazioni genetiche distinte da quelle del clone predominante al momento della diagnosi, suggerendo che le alterazioni che emergono alla recidiva conferiscono resistenza alla terapia (Inaba H. 2013)

Lo studio con citogenetica molecolare nei pazienti con recidiva testicolare isolata ha confermato il dato morfologico e citofluorimetrico dell'assenza di localizzazione midollare.

Conclusioni

Nell'ultimo decennio i test genetici sono entrati a far parte della routine per la diagnosi e la prognosi dei pazienti leucemici così come nel monitoraggio della malattia. La conoscenza delle aberrazioni ha consentito di capire l'origine molecolare della malattia e di guidare il clinico nella scelta della terapia.

La citogenetica aiuta nella stratificazione dei pazienti, l'*array-CGH* è la speranza futura di avere un test che consente una prognosi più precisa e quindi un trattamento farmacologico specifico. La tecnica può consentire infatti di valutare i cambiamenti genetici e di associarli ad una terapia farmacologica mirata essendo certe alterazioni del genoma tipiche di alcuni sottotipi di leucemia. La raccolta di ulteriori informazioni da l'opportunità di definire altri sottogruppi non ancora classificati.

Il nostro lavoro ha permesso di rilevare riarrangiamenti (anche di piccolissime dimensioni) in una coorte di pazienti per ora piccolo ed eterogeneo. I dati ottenuti non consentono attualmente una ulteriore sottostratificazione dei pazienti ma affiancare questa indagine molecolare agli altri test potrà nel tempo essere di estrema utilità per una più precisa classificazione dei profili genomici.

Bibliografia

Bardini M, Woll PS, Corral L, et al.,

Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement. *Leukemia* . 2015 Jan;29(1):38-50.

Baughn LB, Biegel JA, South ST, et al.,

Integration of cytogenomic data for furthering the characterization of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: a multi-institution, multi-platform microarray study. *Cancer Genet*. 2015 Jan-Feb;208(1-2):1-18.

Brüggemann M, Gökbuget N and Kneba M.

Acute Lymphoblastic Leukemia: Monitoring Minimal Residual Disease as a Therapeutic Principle. *Semin Oncol*. 2012a;39:47-57.

Chessels JM, Swansbury GJ, Reeves B, et al.,

Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. 1997 Ottobre; 99 (1): 93-100.

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*. 2013b;98:59-61.

Choy KW, Setlur SR, Lee C, Lau TK.

The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2010; 4: 391-398

D'Angiò M , Valsecchi MG , Testi AM, et al.

Clinical features and outcome of SIL/TAL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a 10-year experience of the AIEOP group. *Haematologica*. 2015 Jan; 100 (1): e10-E 13

Dawson A.J., Yanofsky R., Yanofsky R.,

Array comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis in pediatric acute leukemias *Curr Oncol*. 2011 Oct; 18 (5): E210-E217.

Deepa Bhojwani, Jun J. Yang, and Ching-Hon Pui,

Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia *Pediatr Clin North Am*. 2015 Febbraio; 62 (1): 47-60.

Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A.
Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast Leukemia . 2006 Sep; 20 (9):1496-510.

Greaves MF, Colman SM, Beard ME, et al.
Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the collaborative group study. Leukemia 1993; 7(1):27-34

Greaves MF and Wiemels J.
Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. Nature Rev Cancer. 2003;3:639–649.

Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, et al.
Interphase molecular cytogenetics screening for a UK Cancer Cytogenetics Group Study. Br.J.Haematol. 2005; 129:520-30

Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M et al.,
Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. JClin Oncol 2013 20 Settembre; 31(27:3397-402.

Homminga I, Maartje J. Vuerhard, Anton W. Et al.,
Characterization of a pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patient with simultaneous LYL1 and LMO2 rearrangements Haematologica. 2012 Feb; 97 (2): 258-261.

Homminga I, Pieters R, Langerak AW, et al.,
Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell. 2011 Apr 12;19(4):484-97

Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, Papayannidis C et al.,
The *PAX5* gene is frequently rearranged in *BCR-ABL1*-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Haematologica 2010;95(10)

Inaba H, Greaves M., Mullighan CG,
Acute lymphoblastic leukaemia Lancet. 2013 June 1; 381(9881):

Jeffrey W. Taub, Mark A. Konrad, Yubin Ge, et al.

High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99:2992-2996.

Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M et al.,
Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray *Proc Natl Acad Sci US A*. 2008 19 agosto; 105 (33): 11.921-11.926.

Mangum DS, Downie J, Mason CC, Jahromi M S, et al.
VPREB1 deletions occur independent of lambda light chain rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia *Leukemia* 2014 Jan; 28(1): 216–220.

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*. 2012b; 30:3100-8.

Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al.,
Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*.2007 Apr 12;446(7137):758-64.

Oostlander AE, Meijer GA Ylstra B.
Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet*. 2004 Dec;66(6):488-95

Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, et al.
RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2014 Feb;46(2):116-25

Pui CH, Robinson LL, Look AT.
Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1030-1043

Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM.
Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.2004:118-45

Rand V, Parker H, Russell Lisa J, et al.,
Genomic characterization iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2011 June;117-25

Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care*. 2005; 14:53-62.

Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA
Deregulated expression of cytokine receptorgene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009 Sep 24;114(13):2688-98.

Sarhadi VK, Lahti L, Scheinin I, et al.,
Targeted resequencing of 9p in acute lymphoblastic leukemia yields concordant results with array CGH and reveals novel genomic alterations. *Genomics*. 2013 Sep;102(3):182-8.

Sante Tura, Corso di malattie del sangue e degli organi emopoietici Eusculapio, 2011

Virinder Kaur Sarhadi , Leo Lahti , Ilari Scheinin et al., Targeted resequencing of 9p in acute lymphoblastic leukemia yields concordant results with array CGH and reveals novel genomic alterations. *Genomics* 102 (2013) 182–188

Widmann - Interpretazione clinica degli esami di laboratorio McGraw-Hill 2001

Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms, and epidemiology. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008;(39):87-90.

Ringraziamenti

Ringrazio il Professor Paolo Moi e la Professoressa Maria Cristina Rosatelli rispettivamente coordinatore e tutor del mio dottorato, per la disponibilità che hanno sempre mostrato nei miei confronti.

Ringrazio la Dottoressa Rossella Mura che ha accettato con entusiasmo di farsi coinvolgere in questo progetto dandomi la disponibilità e il supporto scientifico per studiare i pazienti del suo reparto.

Ringrazio la Dottoressa Daniela Gasperini per avermi seguito in questi tre anni di dottorato e avermi aiutato nella stesura di questa tesi.

Ringrazio anche tutti i colleghi del laboratorio di citogenetica (Bruna, Danila, Graziella, Lina, Luciana e Pietro) con cui lavoro da tanti anni e che mi sono stati sempre vicini oltre che da un punto di vista professionale anche nelle tante occasioni belle e brutte che la vita mi ha riservato.

Ringrazio infine mio marito e i miei genitori, le persone più importanti della mia vita, per avermi sempre sostenuto anche nelle scelte lavorative.