

Significato dell'analisi citogenetica e citogenetico-molecolare nella diagnosi e nella prognosi delle neoplasie ematologiche

Cytogenetics and molecular cytogenetics in diagnosis and prognosis of hematologic malignancies

Summary

Conventional Cytogenetic Analysis along with molecular cytogenetics techniques (e.g. Fluorescence in situ Hybridization, FISH) greatly contributed to the identification of recurrent chromosomal abnormalities in hematologic malignancies, often related to clinical and pathological features. Thus, cytogenetic analysis could be considered an essential tool to correctly define the diagnosis and the prognostic risk in many tumors. The knowledge of chromosomal and molecular abnormalities led to the elucidation of etiopathogenetic mechanisms which cause a loss of control in self-renewal, apoptosis and proliferation and gave the basis for the development of gene-targeted therapy.

Ciccone M, Cavazzini F, Castoldi G. Cytogenetics and molecular cytogenetics in diagnosis and prognosis of hematologic malignancies. *Trends Med* 2006; 6(1):33-47.

© 2006 Pharma Project Group srl

Maria Ciccone, Francesco Cavazzini, Gianluigi Castoldi

Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Terapie Avanzate
Università degli Studi di Ferrara

Key words:

cytogenetics

FISH

hematologic malignancies

Lo studio delle aberrazioni cromosomiche nelle malattie oncoematologiche rappresenta ancor oggi il modello attraverso il quale può essere raggiunta l'identificazione di un "marcatore" di malattia di altissimo valore clinico-prognostico, spesso in grado di spiegare alcune caratteristiche biologiche delle cellule tumorali e quindi stimolare valide ipotesi per un trattamento mirato.

Sono ormai descritte numerose alterazioni citogenetiche in corso di malattie ematologiche, alcune delle quali hanno assunto un preciso significato diagnostico-prognostico.

Aspetti Metodologici

La ricerca nell'ambito della citogenetica (studio dei cromosomi) e della biologia molecolare (lo studio, strutturale e funzionale, dei geni e dei loro trascritti) ha fornito alcune valide me-

todiche di studio, col fine principale di identificare difetti del DNA in grado di spiegare la patogenesi e la fisiologia della malattia tumorale.

L'Analisi Citogenetica Convenzionale (ACC) consiste nello studio microscopico dei 23 cromosomi umani, permettendo una valutazione della ploidia cellulare (alterazioni numeriche, ad es.: trisomie, monosomie) e l'eventuale identificazione di aberrazioni cromosomiche ricorrenti, siano esse bilanciate (cioè avvengono senza perdita netta di materiale genomico), come molte traslocazioni, o sbilanciate (cioè con perdita netta di materiale genomico) quali le delezioni¹. Il materiale di studio è rappresentato dalla popolazione del tessuto tumorale: sangue periferico o midollare nel caso esista una componente leucemica o cellule ottenute da separazione di tessuto linfonodale (sindromi linfoproliferative) o altri tes-

✉ **Maria Ciccone**

Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Terapie Avanzate
Università degli Studi di Ferrara
Via Savonarola 9
44100 Ferrara
Tel +39.0532203091
e-mail: sse@unife.it

suti più raramente sede di malattia (cute, mucose).

Il vantaggio principale della ACC risiede nella visione ad ampio spettro che immediatamente si ottiene in base alla analisi della morfologia e del bandeggio dei singoli cromosomi. Aberrazioni numeriche quali copie aggiuntive o mancanti di un determinato cromosoma vengono immediatamente identificate, e più generalmente è sempre possibile stabilire il grado di ploidia della cellula. Inoltre, le peculiari caratteristiche ottenute per mezzo del bandeggio cromosomico con colorazione citochimica (da cui derivano rispettivamente il bandeggio G, da Giemsa, e R da "Reverse", figura 2) o fluorescente (bandeggio Q da Quinacrina) rendono ogni coppia di omologhi identificabile in maniera incontrovertibile: questo rende possibile l'identificazione di fenomeni quali le traslocazioni, cioè lo scambio di parte del DNA genomico da un cromosoma ad un altro.

I limiti principali della metodica risiedono nel fatto che l'analisi del bandeggio implica l'acquisizione e la lettura di un certo numero di metafasi (standardizzato in almeno 20), che non sempre è possibile raggiungere. In determinate patologie, infatti, l'indice di proliferazione neoplastica è estremamente basso, rendendo quasi impossibile la ricerca di un adeguato numero di metafasi in tempi ragionevolmente utili. Un esempio è fornito dalla *Leucemia Linfatica Cronica (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL)*, nella quale gli studi di citogenetica convenzionale riportati alla fine degli anni Settanta rivelavano un cariotipo normale nella maggior parte dei casi, mentre l'unica anomalia citogenetica ricorrente, peraltro in

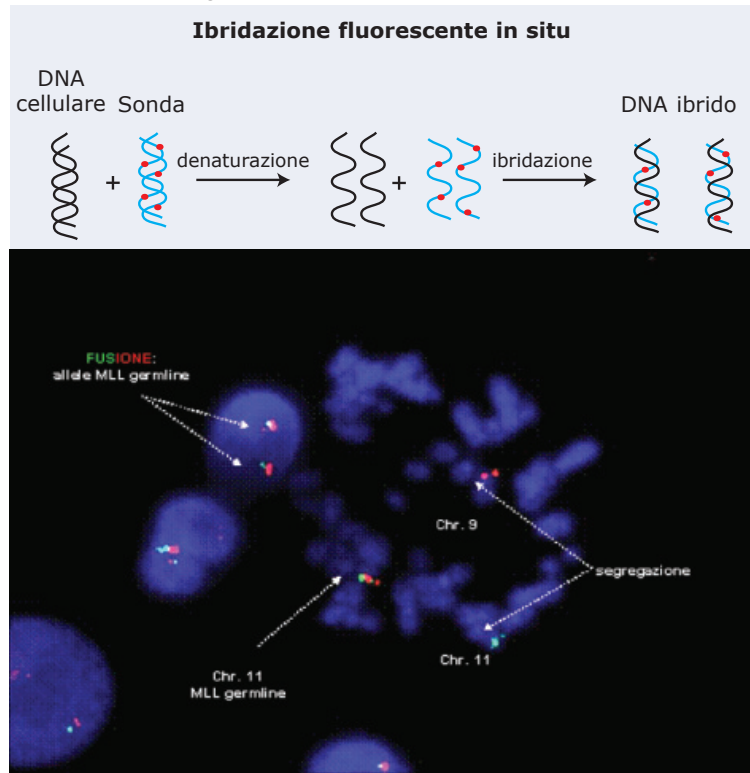
un numero limitato di casi, sembrava essere un cromosoma addizionale in q del 14 (14q+)^{2,3}. L'introduzione di mitogeni specifici per i linfociti B (es.: lipopolisaccaride di *E. Coli*, LPS) ha consentito l'identificazione di un maggior numero di metafasi con anomalie ricorrenti⁴. Il riscontro della trisomia del cromosoma 12, unitamente alla delezione del braccio lungo del cromosoma 13, rappresentano le prime aberrazioni cromosomiche ricorrenti per le quali venne stabilito una chiara correlazione con l'andamento clinico della malattia^{5,6}.

La presenza di anomalie citogenetiche ricorrenti ha condotto molti laboratori ad optare per metodi in grado di sganciarsi dal vincolo dell'analisi in metafase

e sfruttare il grande numero di interfasi (nuclei) clonali per una corretta stima di alcune possibili anomalie^{7,8}.

Tecnicamente questo è stato possibile mediante l'ibridazione del DNA tumorale con oligonucleotidi di DNA ad alta omologia per determinate sequenze bersaglio e marcati con sostanze radioattive o fluorescenti (in modo tale da poterlo rendere riconoscibile all'esame microscopico in fluorescenza come segnali luminosi, figura 1). L'ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti (*Fluorescence In Situ Hybridization, FISH*) è in grado di garantire un gran numero di interfasi analizzabili in funzione di una sequenza "bersaglio" stabilita a priori. In questo modo, laddove la CCA identifi-

Figura 1. Principio dell'ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti. Nel pannello in basso: esperimento con sonda a due colori identificante il gene MLL sulla banda 11q23; le interfasi mostrano due alleli di MLL intatti (visibili come segnali di fusione). La metafasi mostra la segregazione del segnale rosso dal segnale verde, indicante una traslocazione del gene MLL.



ca un marcatore di malattia, esso, mediante FISH, può agevolmente essere monitorato senza la necessità di valutare le metafasi.

In tempi più recenti sono state sviluppate metodiche che sfruttano il principio della ibridizzazione applicato alla metafase: cioè tecnologie in cui l'analisi della metafase diviene funzione della corretta ibridazione di determinate sonde fluorescenti con le loro sequenze omologhe. La "Comparative Genomic Hybridization" (CGH) sfrutta la competizione su metafasi normali di eguali quantitativi di DNA tumorale e di DNA sano, marcati in colori rispettivamente diversi⁹. Si tratta quindi di una ibridazione che come substrato ha metafasi normali e come sonde il DNA tumorale *in toto* in competizione con DNA sano. Il rapporto ottenibile fra l'intensità dei due colori in fluorescenza riflette il rapporto fra DNA tumorale e DNA controllo in determinate regioni cromosomiche e viene misurato con uno specifico sistema di analisi computerizzata. In caso di sbilanciamenti quantitativi nel DNA tumorale, l'intensità del colore della sonda ibridizzata sul cromosoma indicherà una perdita o un guadagno in una determinata banda, a seconda che vi si leghi più o meno DNA tumorale. La CGH si è rivelata utile nello studio di perdite o guadagni di materiale cromosomico, specialmente nei casi di malattie tumorali a cariotipo normale, ma un limite risiede nel fatto che alterazioni bilanciate del cariotipo (traslocazioni) non vengono riconosciute.

La "Multicolor-FISH" (M-FISH) è un'altra metodica di ibridazione fluorescente che sfrutta i criteri dell'analisi citogenetica convenzionale¹⁰. In questo caso,

le metafasi ottenute dal tessuto tumorale vengono ibridizzate con un pannello di sonde in grado di "colorare" in maniera specifica ogni singolo cromosoma. La metodica riconosce traslocazioni a due o più vie, cromosomi "marcatori" non identificabili con il bandeggio, anomalie numeriche ed è solitamente riservata all'approfondimento di singoli casi a cariotipo complesso non interpretabili con la ACC.

Negli ultimi anni, infine, il completamento del sequenziamento del genoma umano ha favorito l'evoluzione di tecniche di ibridazione impieganti matrici di cloni contenenti sequenze genomiche determinate (*arrays*), allontanando lo studio delle anomalie geniche dall'osservazione morfologica del cromosoma e aprendo la strada alla cosiddetta "genomica", lo studio globale dell'assetto e dell'espressione genica nelle diverse malattie¹¹.

Verranno di seguito illustrati alcuni dei più significativi esempi dell'applicazione delle metodiche di citogenetica convenzionale e molecolare in ambito oncoematologico.

Leucemia mieloide cronica

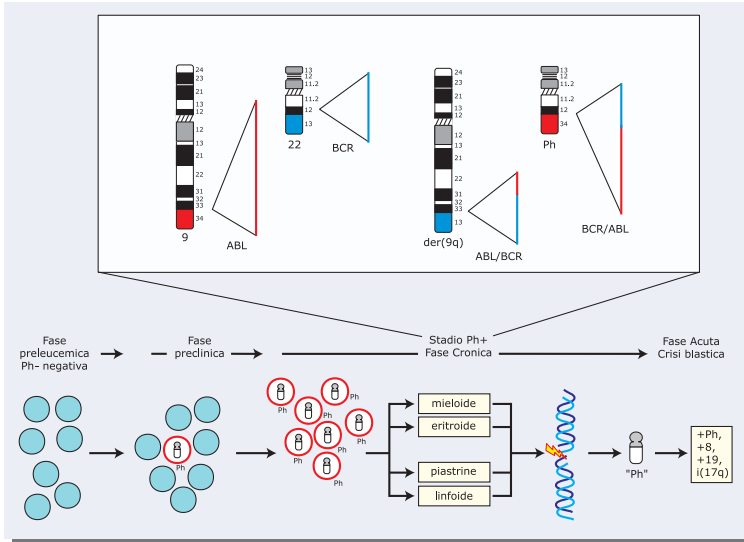
La Leucemia Mieloide cronica (LMC) rappresenta un disordine mieloproliferativo derivante dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale del midollo osseo. La LMC si configura clinicamente come una malattia contrassegnata da un decorso difasico, caratterizzato, nella fase iniziale (fase cronica) da elevata granulocitosi periferica e da un'espressione del compartimento mieloide documentato da un quadro midollare ipercellulare, e da una fase

terminale associata ad un incremento marcato degli elementi blastici (metamorfosi o crisi blastica) riprodotte le manifestazioni di una forma leucemica acuta. Il passaggio dalla fase cronica a quello di blastosi è annunciato da modificazioni cliniche ed ematologiche quali l'incremento della splenomegalia, l'aumento nel sangue periferico di elementi immaturi e della serie basofila, l'occorrenza di anomalie citogenetiche secondarie quali la duplicazione del cromosoma Philadelphia, la trisomia del cromosoma 8, la trisomia del cromosoma 19 e l'isocromosoma 17q (figura 2).

Nel 1960 venne per la prima volta descritta una anomalia cromosomica caratteristica della Leucemia Mieloide Cronica, descritta come delezione del braccio lungo del cromosoma 22 e denominata cromosoma Philadelphia in onore della città in cui fu scoperta¹². Alcuni anni dopo, JD Rowley dimostrò come in realtà il cromosoma Philadelphia fosse uno dei derivativi di una traslocazione bilanciata fra il braccio lungo del cromosoma 9 ed il braccio lungo del cromosoma 22, indicata come t(9;22)(q34;q11) (figura 3)¹³.

Questo tipo di traslocazione comporta a livello molecolare il trasferimento del proto oncogene *c-abl* (un gene codificante per una proteina ad attività tirosin chinasi normalmente localizzato a livello della banda q34 del cromosoma 9) in corrispondenza di un ristretto segmento di circa 6 kb del cromosoma 22, in corrispondenza della banda q11, designato "breakpoint cluster region", *bcr*. Il segmento *bcr* si viene a situare a livello della porzione media di un gene di 130 kb, denominato BCR. Per effetto della rottura del gene BCR, la sua porzione centromerica

Figura 2. In seguito alla traslocazione fra il braccio lungo del cromosoma 9 e il braccio lungo del 22 si forma il gene di fusione bcr/abl. La comparsa del cromosoma Ph segna la manifestazione clinica della fase cronica della LMC. La comparsa di anomalie citogenetiche aggiuntive corrisponde alla evoluzione della malattia in crisi blastica.



viene a giustapporsi alla sequenza di DNA traslocata del gene ABL, creando un gene chimerico BCR-ABL a livello del braccio lungo del cromosoma 22. Questo gene codifica per un trascritto di 8,5 Kb a sua volta tradotto in una proteina chimerica di 210 kD, dotata di una attività tirosino-chinasica esuberante, in grado di sovvertire i circuiti fisiologici di segnalazione intracellulare, col risultato di spostare l'omeostasi verso una iperproliferazione incontrollata degli elementi della filiera mieloide. Clinicamente tale lesione citogenetico-molecolare corrisponde ad un fenotipo noto dalla metà del 1800 e caratterizzato da leucocitosi neutrofila, precursori mieloidi circolanti e neutrofili disfunzionali (la reazione citochimica della fosfatasi alcalina è di intensità ridotta), splenomegalia e una sopravvivenza variabile da due a cinque anni se non trattata¹⁴.

Lo sviluppo di indagini citogenetico-molecolari ad alta sensibilità e di applicazione alla rou-

tine diagnostica ha permesso di monitorare la presenza di questo marcatore in funzione del trattamento, cioè di ottenere una precisa quantificazione del clone neoplastico in risposta alla terapia.

Recentemente la sintesi di un inibitore della attività tirosino-chinasica della proteina di fusione (STI571) ha reso possibile la negativizzazione del marcatore ai test citogenetico-molecolari in

un elevato numero di casi, consentendo un incremento della sopravvivenza¹⁵⁻¹⁸.

Sindromi mielodisplastiche

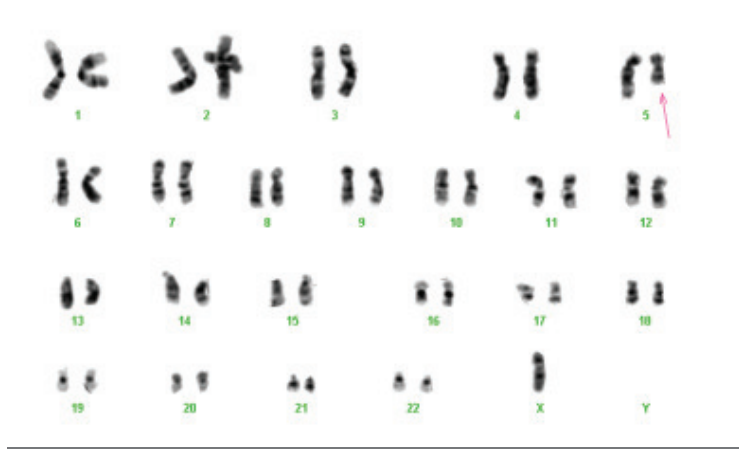
La prima anomalia citogenetica ricorrente descritta in una serie di sindromi mielodisplastiche (SDM) è stata la delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 5 (figura 4)¹⁹. Il fatto che sia stato possibile stabilire una serie di correlazioni fra caratteristiche cliniche dei pazienti, quadro citologico e prognosi (valutata come evoluzione in leucemia acuta) giustifica l'inserimento da parte della Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) di una entità denominata "sindrome da 5q-" all'interno dei disordini mielodisplastici²⁰.

Analogamente alla maggior parte delle aberrazioni citogenetiche riportate in ampie casistiche di mielodisplasie, l'aberrazione in 5q31 è rappresentata da una delezione, cioè da perdita netta di materiale cromosomico. In genere, la presenza di una delezione implica almeno tre considerazioni logicamente collegate:

Figura 3. Cariotipo 46, XX, t(9;22)(q34;q11).



Figura 4. Cariotipo, con delezione del cromosoma 5 alla banda q31 (vedi freccia) in un caso di MDS.



a) selezionando un numero statisticamente significativo di casi, è possibile identificare un segmento di DNA comunemente deletato? b) all'interno di questo segmento esistono sequenze codificanti per geni con putativo potere oncosoppressore? e se è possibile identificare un tale gene c) il restante allele è coinvolto in altri eventi mutazionali? Lo studio citogenetico e molecolare delle mielodisplasie è stato incentrato soprattutto sull'approfondimento delle numerose delezioni descritte in questi quadri patologici. Accanto alla sindrome del 5q-, sono stati descritti altri quadri clinico-pato-

logici correlanti con specifiche anomalie citogenetiche. La monosomia del cromosoma 7 (o la delezione parziale in 7q) è associata a una riduzione della sopravvivenza e alla aumentata tendenza ad evolvere in leucemia acuta²¹⁻²³; la delezione del braccio lungo del cromosoma 20 è stata riscontrata in circa il 5% delle SMD²⁴. Delezioni meno frequenti ma di chiaro interesse speculativo sono state descritte a carico delle bande 13q14 (gene RB) e 11q14-21²⁵. La delezione in 17p13, con coinvolgimento del gene TP53, sembra essere più frequente nei casi di SMD secondaria^{26,27}. Fra le

anomalie numeriche, la trisomia del cromosoma 8 (+8) rappresenta quella più frequente insieme alla monosomia del cromosoma 7²⁸. Il significato prognostico della +8 rimane controverso rimanendo in un gruppo intermedio fra la sindrome da 5q- e la monosomia del cromosoma 7 (tabella 1).

Rappresentando evidentemente un gruppo patologico eterogeneo, non è possibile distinguere un marcatore citogenetico di mielodisplasia. Un fattore di cui è necessario tenere conto inoltre è il fatto che, in casi di SMD con andamento clinico sfavorevole, l'area di sovrapposizione diagnostica con la leucemia acuta aumenta non solo a fronte di criteri clinici, laboratoristici e cito-morfologici, ma anche a fronte del maggiore riscontro di anomalie a prognosi sfavorevole tipiche delle leucemie acute mieloidi quali 5q-, 7q-, aberrazioni di 11q23 e cariotipo complesso²⁹.

Qualora si considerino i risultati della ACC, una sostanziale porzione di casi di MDS presenta alla diagnosi un cariotipo normale. Questo può dipendere a) dalla effettiva assenza di anomalie cromosomiche; b) dalla presenza di cloni a basso indice pro-

Tabella 1. Anomalie citogenetiche maggiormente frequenti nelle Sindromi Mielodisplastiche.

Aberrazioni non bilanciate (acquisizione o perdita di materiale cromosomico)		Anomalie strutturali (traslocazioni bilanciate, inversioni, inserzioni)
del(5q)-monosomia 5	Trisomia 8	t(1;3)(p36;q21)
del(7q)-monosomia 7	Trisomia 9	t(1;7)(q10;p10)
del(11q)	Trisomia 19	inv(3)(q21;q26)
del(12p)	Trisomia 21	ins(3;3)(q21;q21q26)
del(13q)		t(3;3)(q21;26)
del(20q)		t(6;9)((p23;q34)
monosomia X		inv(16)(p13;q22)
monosomia Y		t(16;16)(p13;q22)
		del(16)(q22)
		iso(17q)

liferativo (che cioè non garantiscono un numero sufficiente di metafasi analizzabili); c) dalla presenza di aberrazioni “criptiche”, al di sotto del potere risolutivo del bandeggio. In questi casi, sulla base di una classificazione delle più frequenti aberrazioni cromosomiche nelle SMD e del loro significato prognostico, metodiche in grado di effettuare l'analisi su grandi numeri e di valutare l'assetto di specifici loci sul DNA (es.: FISH con sonde locus-specifiche) possono risultare di notevole utilità.

E' stato dimostrato come una parte di pazienti con SMD e cariotipo normale presentino, all'analisi in FISH, cloni di cellule citogeneticamente anomali che potrebbero giocare un ruolo importante nella progressione della malattia³⁰.

Metodiche più articolate quali la M-FISH, applicate ai casi di SMD a cariotipo complesso e alto rischio citologico, hanno contribuito ad evidenziare la presenza di classiche anomalie ad alto rischio, sottolineando come cloni citogeneticamente instabili inevitabilmente evolvano in leucemia acuta, con aberrazioni tipiche dei gruppi a prognosi infausta³¹.

Il ruolo della citogenetica nelle SMD come indice di prognosi è stato ampiamente riconosciuto sin dalla metà degli anni 80 ed è una delle tre variabili (insieme a dati cito-morfologici e clinici) del Sistema di Valutazione Prognostica delle SMD (International Prognostic Scoring System, tabella 2)³²⁻³⁴.

Inoltre è stato dimostrato che anche l'evoluzione del cariotipo nelle SMD (la comparsa di anomalie secondarie nel corso della malattia) può avere un significato clinico³⁵.

Leucemie acute

Il cariotipo rappresenta probabilmente il più importante indice diagnostico e prognostico nelle *Leucemie Acute Mieloidi (LAM)*^{32,36,37}. La World Health Organization (WHO) ha introdotto una rilevante distinzione fra due gruppi di LAM con differenti caratteristiche biologiche: LAM insorgenti *de novo* e LAM secondarie a SMD o quadri simili (correlate a precedente trattamento chemioterapico), riconoscendo il valore primario della ACC nella collocazione clinico-prognostica di alcuni gruppi specifici di malattia (tabella 3)²⁰. La presenza di alcune tra-

slocazioni ben riconoscibili quali la t(15;17)(q22;q21), t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13;q22)/inv(16)(p13q22) e le traslocazioni coinvolgenti 11q23 correla infatti con quadri morfologici, immunofenotipici e clinici peculiari, tali da indirizzare con precisione la corretta scelta del percorso terapeutico. Inoltre, le diverse aberrazioni cromosomiche, strutturali e numeriche, e il grado di complessità del cariotipo (più o meno di tre anomalie) sono state distribuite secondo un ordine gerarchico in base alla correlazione con sopravvivenza e risposta al trattamento (tabella 4)²⁹.

Il valore della analisi di bandeggio è in tutti questi casi diagnostico. Metodiche semplici e riproducibili di citogenetica molecolare (FISH) e di biologia molecolare (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) sono in grado di garantire un attento monitoraggio della massa di malattia durante il trattamento.

Numerosi studi³⁸⁻⁴¹ hanno messo a confronto la sensibilità di ACC e FISH nel rilevamento delle anomalie citogenetiche a carattere prognostico significativo nelle LAM insorgenti *de novo* nell'adulto. Ne è emerso che per alcune anomalie l'indagine cito-

Tabella 2. MDS International Prognostic Scoring System.

INDICE PROGNOSTICO INTERNAZIONALE					
Punteggio	0	0.5	1	1.5	2
Blasti (%)	< 5	5-10	-	11-20	21-30
Cariotipo *	Prognosi buona	Prognosi intermedia	Prognosi severa		
Citopenia **	0/1	2/3			
SCORE PER GRUPPO DI RISCHIO					
	Basso	Intermedio 1	Intermedio 2	Elevato	
	0	0.5-1	1.5-2	2.5	
* Prognosi buona (cariotipo normale, -Y, del5q, del20q); severa (anomalie del cromosoma 7 e cariotipo complesso); intermedia (+8, coinvolgimento 1 o 2 cromosomi);					
** Citopenia valutata empiricamente (classi 0, 1, 2, 3).					

Tabella 3. Classificazione WHO delle Leucemie Acute Mieloidi e comparazione con il sistema Franco-Americano-Britannico (FAB).

WHO Leucemia Acuta Mieloide (AML) (≥20% blasti midollari)	FAB AML (>30% blasti midollari) e RAEB-t (>20% ma <30% blasti midollari)
Gruppo 1: AML con anomalie citogenetiche ricorrenti AML con t(8;21)(q22;q22), (AML/ETO) Leucemia Acuta Promielocitica con t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α) e varianti AML con eosinofilia midollare e inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22), (CBF/MYH11) AML con aberrazioni di 11q23 (MLL)	(M2) M3, M3v M4 eo (M1, M2, M4, M5)
Gruppo 2: AML con displasia multilineare Post-MDS o MDS/MPD (myeloproliferative disease) Senza precedente fase MDS o MDS/MPD ma con displasia in almeno il 50% delle cellule in ≥2 linee mieloidi	(Leucemia acuta trilineare)
Gruppo 3: AML e MDS, therapy related Agenti alchilanti/radiazioni Inibitori della Topoisomerasi II Altre	
Gruppo 4: AML, non altrimenti classificabili AML, a minima differenziazione AML, senza segni di maturazione AML, con maturazione AML, mielomonocitica AML, monoblastica/monocitica Leucemia eritroide acuta Leucemia megacarioblastica acuta Leucemia basofila acuta Panmielosi acuta con mielofibrosi Sarcoma mieloide	M0 M1 M2 M4 M5a, M5b M6 M7 Leucemia acuta bifenotipica Leucemia acuta biclonale Leucemia acuta indifferenziata

genetico-molecolare (FISH) possiede una sensibilità nettamente maggiore rispetto all'analisi del bandeggio, essendo in grado di individuare casi falsamente negativi alla citogenetica convenzionale. Questo in particolare è vero per alcune anomalie quali la inv(16)/t(16;16) e le traslocazioni di 11q23, specialmente nei casi in cui le metafasi analizzate dopo bandeggio presentino una qualità sub-ottimale³⁸.

Circa il 50% dei casi di LAM *de novo* presenta un cariotipo nor-

male alla ACC. In questi casi, l'applicazione della FISH è in grado di rilevare anomalie genomiche nel 3% circa dei casi^{38,41}, permettendone la collocazione in determinate categorie di rischio. Lo studio dei casi a cariotipo normale mediante metodiche di biologia molecolare (PCR) ha inoltre dimostrato come eventi mutazionali a carico del gene FLT3 ricorrano nel 25% circa delle LAM, spesso in assenza di alterazioni visibili al cariotipo e correlino in maniera altamente specifica con una pro-

gnosi sfavorevole^{42,43}. Di grande interesse è infine la dimostrazione di alterazioni coinvolgenti il gene NUP98⁴⁴.

Anche lo studio dei casi di LAM secondarie a cariotipo normale ha dimostrato come anomalie citogenetiche al di sotto del limite di risoluzione della ACC possano essere rilevate in FISH in circa il 30% dei casi⁴⁵.

Le *Leucemie Acute Linfoblastiche (LAL)* rappresentano un gruppo di patologie leucemiche, cioè con un'estrinsecazione principalmente a livello di midollo

Tabella 4. Classificazione gerarchica delle anomalie citogenetiche nelle AML.

Aberrazioni cromosomiche	Frequenza	Prognosi
t(8;21)(q22;q22)	~12	Buona
t(15;17)(q22;q21)	~10	Buona
inv(16)(p13;q22)	~10	Buona
del(16)(q22)		
t(9;11)(p22;q23)	5-6	Cattiva
inv(3)(q21;q26), t(3;3)	3-5	Non definite
t(1;3)(p36;q21)		
del(11)(q23)		Cattiva
t(6;9)(p23;q34)	~1	Cattiva
t(8;16)(p11;q13)	<1	Non definita
t(1;7)(q10;p10)	1	Cattiva
t(3;21)(q26;q22)	<1	Cattiva
Anomalie numeriche		
+4, +11, +21	1-3	Non definita
+8, -5, -7	>40	Cattiva/pessima
Delezioni		
5q, 7q, 12p, 20q	>40	Cattiva/pessima

osseo e sangue periferico, clinicamente caratterizzate dai sintomi derivati dalla occupazione dello spazio midollare (anemia, suscettibilità alle infezioni e diatesi emorragica). Al contrario che per le LAM, non esistono dei reali criteri morfologici per la distinzione dei diversi tipi di LAL, che si basa invece sull'impiego di un pannello di anticorpi monoclonali per lo studio dell'immunofenotipo (tabella 5).

Citogeneticamente è possibile distinguere lesioni ad alto rischio quali la t(9;22), le traslocazioni della banda 11q23 coinvolgenti il gene MLL, lesioni a basso rischio come un assetto iperdiploide del cariotipo e lesioni a rischio intermedio come la t(1;19) (tabella 6)⁴⁶. Tutte le traslocazioni portano alla formazione di un gene di fusione, il cui trascritto è verosimilmente in grado di interagire con se-

quenze geniche deputate alla differenziazione e alla proliferazione cellulare. Dal punto di vista strettamente funzionale nella biologia del tumore, tali lesioni non differiscono da quelle descritte nelle LAM e il loro monitoraggio (trattandosi del rilevamento o di un gene di fusione o di un trascritto di fusione) è possibile sia in FISH sia con tecniche di biologia molecolare. Un'eccezione è

Tabella 5. Marcatori immunologici nelle Leucemie Acute Linfoblastiche.

Marcatori		Citogenetica		%	%
				adulto	bambino
B-ALL	CD34 CD19 CD79 α HLA-DR CD10 c μ SIg				
Pro-B	+ + + + - - -	t(4;11)(q21;q23)	10	8	
B-common	+/- + + + + - -	t(9;22)(q34;q11) t(12;21)(p12-q22)	25 2	3 22	
Pre-B	- + + + +/- + -	t(1;19)(q23;p13.3)	3	5	
B matura	- + + + - - +	t(8;14)(q24;q32)	4	2	
T-ALL	cCD3 CD3 CD7 TdT TcR CD1 α CD4				
Pro-T	+ -/+ + + + - -	Traslocazioni di	9	3	
Pre-T	+/- + + +/- + - -	10q24 (geni HOX)			
T corticale	- + + -/+ + + +	Traslocazioni 1p32	12	7	
T matura	- + + - + - +	(TAL1)			

Abbreviazioni: +: positività nei blasti; c: citoplasmatico

Tabella 6. Principali anomalie citogenetico-molecolari in corso di Leucemia Linfoblastica Acuta B cellulare e loro significato prognostico.

Cariotipo	Geni Coinvolti	Prognosi
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	Cattiva
t(12;21)(p12-13;q22)	ETV6-AML1	Cattiva/Intermedia
t(4;11)(q21;q23) e altre traslocazioni di 11q23	MLL	Cattiva
t(1;19)(q23;p13.3)	PBX1-E2A	Intermedia
iperdiploidia	-	Buona

rappresentata dalla t(12;21), un'anomalia non identificabile alla citogenetica convenzionale ma rilevabile esclusivamente con la FISH e definita quindi traslocazione "criptica".

La distribuzione delle lesioni citogenetiche nelle LAL del bambino e dell'adulto subisce alcune modificazioni importanti dal punto di vista prognostico (tabella 5): il 25% circa delle aberrazioni citogenetiche delle LAL del bambino è infatti rappresentato dalla t(12;21) con riarrangiamento dei geni ETV6 e CBFA2, mentre la traslocazione t(9;22) con fusione dei geni BCR e ABL ricorre in un 6% circa dei casi; nelle LAL dell'adulto il quadro si rovescia, con la fusione BCR-ABL presente in circa il 25% dei casi e la t(12;21) in meno del 2% dei casi. Nel bambino risultano inoltre più frequenti il cariotipo iperdiploide e la t(1;19)/E2A-PBX1, mentre meno frequenti appaiono le traslocazioni coinvolgenti il gene c-MYC sul cromosoma 8 (tipiche delle forme linfoproliferative B-cellulari ad alto grado denominate *Linfoma di Burkitt*). Sia nelle LAL del bambino sia in quelle dell'adulto, i riarrangiamenti del gene MLL (banda 11q23) ricorrono con una frequenza del 6-7% circa e mantengono il significato prognostico complessivamente negativo valido anche per le LAM⁴⁶.

Analogamente a quanto descritto per le LAM, la valutazione diagnostica delle LAL deve comprendere lo studio citogenetico, specialmente nei casi di LAL del bambino in cui anomalie numeriche (iperploidia) sono presenti in più del 20% dei casi e posseggono un importante valore prognostico. La FISH per il rilevamento dei riarrangiamenti di ETV6/AML1 e MLL dovrebbe sempre essere eseguita, così come in tutti i casi in cui l'analisi del bandeggio non fornisca risultati adeguati. Inoltre la FISH o metodiche di biologia molecolare sono in grado di fornire una valutazione quantitativa del clone neoplastico nel corso del trattamento, in maniera tale da valutare il grado di risposta.

Disordini linfoproliferativi

L'attuale classificazione delle patologie linfoproliferative (WHO, tabella 7) si basa sul presupposto che ogni proliferazione clonale trovi un corrispondente in appropriati elementi del percorso istogenetico linfoide, nei quali il verificarsi di una lesione genomica crea le condizioni per un vantaggio di crescita sulle restanti popolazioni bloccando il clone ad un determinato stadio dello sviluppo²⁰.

Le anomalie citogenetiche ricorrenti nella patologia linfoproliferativa cronica B cellulare trovano un esempio rappresentativo nelle aberrazioni coinvolgenti la banda cromosomica 14q32, dove è situato il locus codificante per la porzione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (gene V_H). I geni V_H, D_H e J_H subiscono un primo riarrangiamento a livello di elementi B-cellulari immaturi nel midollo osseo (figura 5). Infatti, un riarrangiamento VD_{J_H} funzionale è essenziale per una differenziazione delle cellule pro-B nel compartimento pre-B. Le cellule pro-B che non producono un riarrangiamento VD_{J_H} funzionale vanno incontro ad apoptosi e vengono fagocitate dai macrofagi. La differenziazione degli elementi pro-B in pre-B è contrassegnata dall'espressione della TdT e dalla acquisizione delle catene citoplasmatiche μHC in più del 95% delle cellule. Inoltre vengono "silenziate" le ricombinasi, RAG1 e RAG2, assicurando l'esclusione allelica del locus μ delle catene pesanti; le cellule vanno incontro ad una spinta proliferativa, al termine della quale le ricombinasi vengono riespresse per permettere il riarrangiamento dei loci delle catene leggere⁴⁷.

Questo permette l'espressione del BCR sul linfocito B-immaturo che viene "immerso" nel sangue periferico e può entrare nel parenchima linfonodale.

Tabella 7. Classificazione WHO delle neoplasie linfoidi B-cellulari e comparazione con la classificazione REAL e i criteri diagnostici FAB

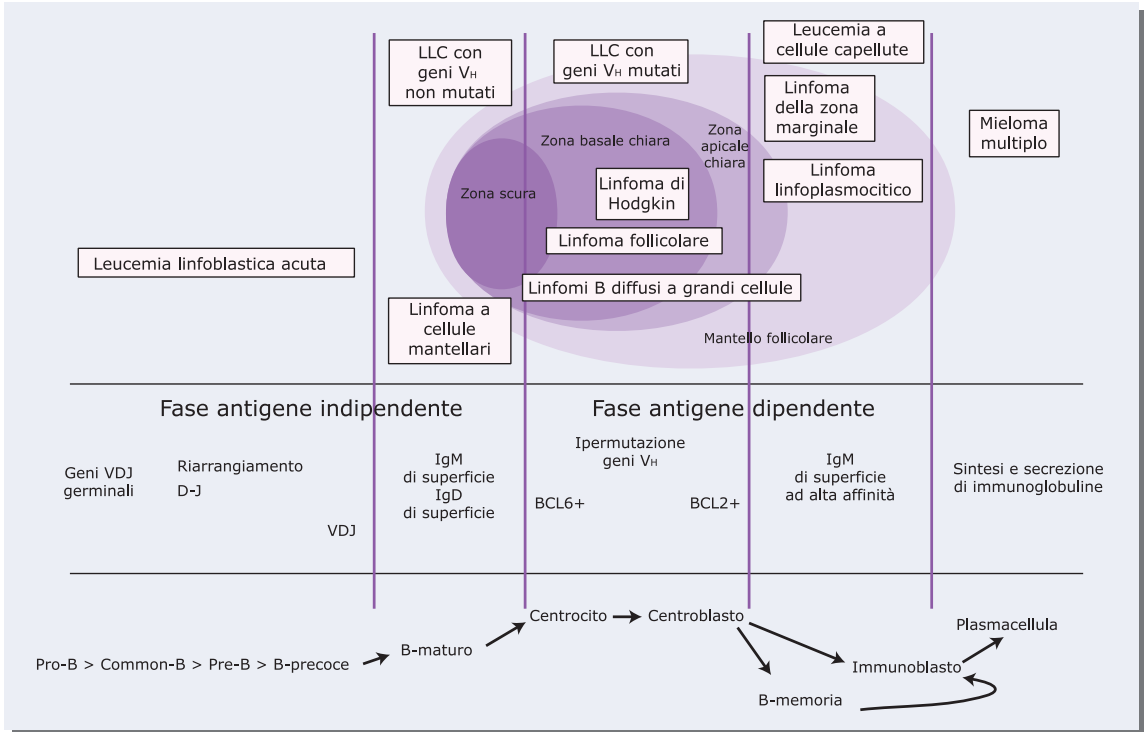
WHO Neoplasie B-cellulari	REAL Linfomi B-cellulari	Citogenetica	Geni coinvolti
Linfoma/leucemia Linfoblastica dei precursori B-cellulari	Linfoma/leucemia Linfoblastica dei precursori B-cellulari	t(9;22)(q34;q11) t(1;19)(q23;p13.3) t(4;11)(q21;q23) t(12;21)(p12-13;q22)	BCR-ABL PBX1-E2A MLL-AF4 ETV6-AML1
B-CLL/Small Lymphocytic Lymphoma (SLL)	B-CLL/ SLL	del(13)(q14) +12 del(11)(q22-23) del(17)(p13)	Marker D13S25 MDM2? ATM TP53
Leucemia prolinfocitica B (B-PLL)	B-PLL		
Linfoma Linfoplasmocitoide	Linfoma Linfoplasmocitoide	t(9;14)(p13;q32)	PAX5-IgV _H
Linfoma a cellule mantellari	Linfoma a cellule mantellari	t(11;14)(q13;q32)	BCL1-IgV _H
Linfoma Follicolare	Linfoma del Centro Follicolare: Grado I Grado II Grado III	t(14;18)(q32;q21)	BCL2-IgV _H
Linfoma Splenico della Zona Marginale (S-MZL); MZL extra-nodale, MALT; MZL linfonodale	Linfoma della zona Marginale (MZL): extranodale MALT Splenico		
Hairy Cell Leukemia	Hairy Cell Leukemia		
Mieloma Plasmacellulare/ plasmocitoma	Mieloma Multiplo	del(13)(q14) traslocazioni 14q32	Rb
Linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL)	DLBCL	traslocazioni 3q27	BCL6
Linfoma B a grandi cellule primitivo del mediastino	Linfoma B a grandi cellule primitivo del mediastino		
Leucemia/Linfoma di Burkitt	Burkitt's Lymphoma DLBCL Burkitt-like	t(8;14)(q24;q32) t(2;18)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	c-Myc
Primary Effusion B-cell Lymphoma (PEL)			

Qui, a livello di centro germinativo (figura 5) avviene la cosiddetta "maturazione per affinità", nel corso della quale viene introdotto un certo numero di

mutazioni (<98% di omologia con la sequenza germinale è comunemente considerato il livello di soglia per distinguerle da possibili polimorfismi) nel gene

immunoglobulinico codificante per la porzione variabile delle catene pesanti (denominato V_H). Dunque il riscontro di un gene V_H "ipermutato" (>2% di mu-

Figura 5. Linfopoiesi B e Linfomi B-cellulari. Nella parte inferiore del pannello sono illustrate le tappe di differenziazione del linfocito B da elemento immaturo a plasmacellula; nella parte intermedia sono illustrati i processi di uso e ipermutazione dei geni delle immunoglobuline; nella parte superiori i principali tipi istologici di linfoma B sono posti in relazione con la loro controparte linfocitaria normale.



tazioni somatiche riscontrabili) indica che la cellula è andata incontro ad una selezione antigenica positiva nell'ambito di una risposta immunitaria classica, T-dipendente. Un analogo processo di "ipermutazione somatica" riguarda anche i geni V_L⁴⁸. L'assenza di mutazioni somatiche del gene V_H indica che la cellula non è passata attraverso il centro germinativo e quindi a) rappresenta un linfocito "vergine", b) è un elemento presentante un BCR già ad alta affinità per un antigene, c) è un elemento selezionato attraverso l'incontro con antigeni che non prevedono l'interazione con cellule T (es.: superantigeni). Risulta chiaro che una regione cromosomica altamente utilizzata sia nelle fasi di maturazione precoce (passaggio da linfocito pro-B a linfocito pre-B) che più tardiva (centroblasto-centroci-

to) è significativamente più esposta ad eventi mutazionali in grado di sovvertire la fisiologia cellulare e promuovere l'indipendenza biologica di un clone. Anomalie della banda 14q32 si riscontrano con frequenza significativa in neoplasie linfoproliferative derivanti sia da elementi precoci nella linfogenesi (*Leucemia Linfoblastica Acuta* e *Linfoma di Burkitt*) e sono rappresentate dalla traslocazione t(8;14)(q32) con coinvolgimento dell'oncogene c-myc, sia derivanti da elementi linfoidi a livello di centro germinativo (*Linfoma Follicolare* con traslocazione fra la banda cromosomica 14q32 e la banda 18, a livello del gene BCL2). Nel caso del Linfoma di Burkitt, la sequenza di DNA derivante dalla traslocazione pone c-Myc in vicinanza di un forte promotore (quello del gene immunoglobulinico),

favorendone la trascrizione anormale; nel caso del Linfoma Follicolare, come risultato della traslocazione si ottiene una giustapposizione del gene BCL2, il cui trascritto ha un potente effetto antiapoptotico, con il promotore del gene V_H. In entrambi i casi, attraverso percorsi molecolari differenti (una prevalente spinta iperproliferativa nel primo caso e una prevalente resistenza all'apoptosi nel secondo), si ottiene un vantaggio di crescita del clone neoplastico. Le traslocazioni coinvolgenti 14q32 nei linfomi sono state inizialmente studiate attraverso le tecniche di citogenetica convenzionale applicate a colture linfocitarie da linfonodo. Lo studio citogenetico del midollo osseo raramente si rivela utile, in quanto la componente linfomatosa rimane prevalentemente li-

mitata alle stazioni linfonodali. L'analisi citogenetica su sangue periferico e su midollo viene facilmente eseguita qualora la patologia linfoproliferativa possieda una importante estrinsecazione leucemica (*Leucemia Linfatica Cronica, Linfoma a Cellule Mantellari, Hairy Cell Leukemia* e più raramente *Linfoma Follicolare leucemizzato* e *Leucemia Plasmacellulare*).

Le tecniche di citogenetica molecolare (FISH) si sono rivelate utili sia nella diagnosi di linfomi in cui la traslocazione di 14q32 è considerata marcatore di malattia (*Linfoma Follicolare* e *Linfoma Mantellare*), sia nello studio di patologie in cui tali traslocazioni posseggono un significato prognostico importante (*Mieloma Multiplo*, figura 6).

Inoltre, l'analisi del locus V_H attraverso metodiche di biologia molecolare (PCR) ha permesso di valutarne il grado di ipermutazione somatica e cioè di stabi-

lire se una determinata cellula è andata o no incontro a selezione antigenica T-dipendente a livello del centro germinativo linfonodale. Secondo questo modello, ogni patologia linfoproliferativa B può venire classificata a seconda della percentuale di mutazioni somatiche del gene V_H in "pre-centro germinativo" (<2% mutazioni somatiche) o "post-centro germinativo" (>2% mutazioni somatiche). Al di là del valore speculativo-nosografico, tale indagine ha permesso di individuare, all'interno della *Leucemia Linfatica Cronica (LLC)*, due sottogruppi, comunemente definiti "mutato" e "non-mutato" in riferimento alla sequenza del gene V_H , con comportamenti clinici estremamente divergenti. Il grado mutazionale del gene V_H è quindi un marcatore prognostico indipendente nell'individuare LLC a prognosi severa ("non-mutate") e LLC ad andamento clinico in-

dolente ("mutate") e pertanto se ne deve tenere conto unitamente alla valutazione citogenetica di rischio nella pianificazione di trattamento e monitoraggio dei pazienti^{49,50}.

Lo studio del genoma nelle neoplasie ematologiche

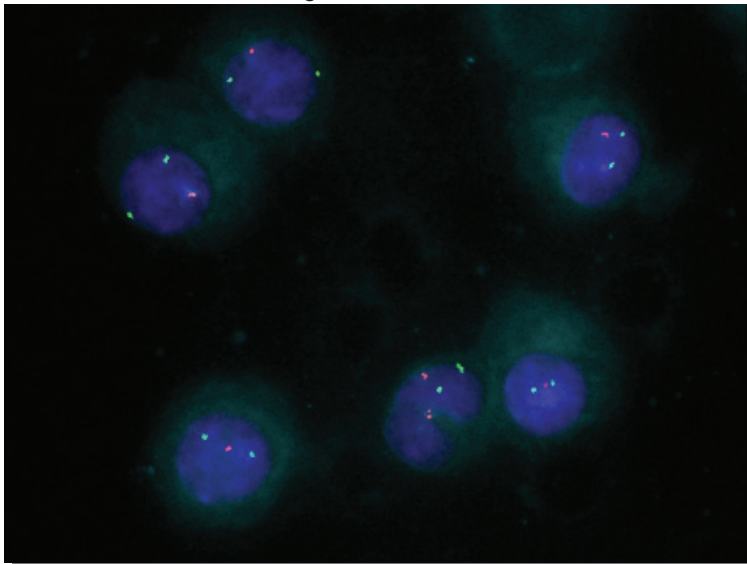
L'attivazione di percorsi molecolari con un ruolo chiave nella proliferazione e nella differenziazione cellulare determina il comportamento di ogni clone neoplastico. Da quanto discusso sinora, appare chiaro come le traslocazioni cromosomiche e gli eventi mutazionali a carico di determinati geni possano alterare l'espressione di una innumerevole serie di altri geni.

Una delle più importanti conseguenze di questa considerazione è la possibilità tecnica di analizzare l'intero genoma di un tumore, al fine di chiarirne alcuni aspetti della fisiologia molecolare ed identificare in tal modo percorsi critici che potrebbero rappresentare potenziali obiettivi per una terapia mirata.

Il completamento della sequenza del genoma umano e la registrazione dei cloni di DNA corrispondenti a specifici loci in banche dati consultabili in rete ha permesso lo sviluppo di tecnologie innovative che, mantenendo come principio base l'ibridizzazione di sequenze di DNA omologhe, sono in grado di fornire informazioni circa l'espressione genica nel clone neoplastico.

Nei "microarray" a DNA, le sonde sono rappresentate da frammenti di cDNA generati per mezzo di amplificazioni in PCR di inserti cDNA in vettori quali ad esempio cloni artificiali batterici (*Bacterial Artificial Clones*,

Figura 6. FISH su preparato di midollo osseo. Segnale rosso: 13q14, segnale verde: controllo, centromero chr. 10. Le plasmacellule sono identificate mediante immunofluorescenza con siero monoclonale anti-catene leggere. Gli elementi plasmacellulari sono caratterizzati dalla presenza di un singolo segnale rosso (delezione 13q14). L'unico elemento mieloidale presente (nucleo reniforme) non presenta tale distribuzione anomala dei segnali.



BAC), che vengono fatti aderire all'interno di un pozzetto di dimensioni microscopiche mediante braccia robotiche. Questi cDNA risultano quindi "schierati" in file ordinate su una superficie di pochi centimetri quadrati.

Il campione di studio può essere rappresentato virtualmente da qualsiasi tessuto: risulta intuitivo che, occorrendo una certa quantità di materiale con una bassissima percentuale di contaminazione, neoplasie con una estrinsecazione a livello di sangue periferico siano un modello ideale. Dal campione si ottiene l'mRNA patologico, che dovrà essere confrontato con il messaggero di un secondo campione scelto come controllo. Entrambi i mRNA vengono trascritti in cDNA (mediante una transcriptasi inversa), molto più stabile dal punto di vista molecolare, e quindi i cDNA vengono amplificati e ritrascritti in cRNA e marcati con biotina. In questo modo si consente un'efficiente ibridazione e rilevazione del segnale. I due messaggeri marcati vengono ibridizzati sull'"array" contenente le migliaia di sequenze geniche in file ordinate. Il preparato è quindi sottoposto alla lettura da parte di uno "scanner" in grado di valutare le variazioni della fluorescenza emanata da ciascun pozzetto e quindi di tradurla in informazioni riguardanti il grado di espressione di quel determinato trascritto. La comparazione fra i livelli di espressione del campione in esame e del controllo consentirà di va-

lutare se singoli geni sono iperespressi o down-regolati.

Il numero di geni analizzati in questo tipo di esperimenti supera comunemente i 20000, per cui si rende necessario l'uso di sofisticati programmi statistici in grado di distribuire i dati secondo algoritmi statisticamente significativi e riproducibili. Generalmente i dati possono venire ordinati secondo un'analisi "supervisionata" ("*supervised learning*"), nel quale classi geniche note vengono delineate in modo da identificare precisamente geni che correlano con caratteristiche quali il tipo di malattia o il decorso clinico, oppure secondo un'analisi "non supervisionata" ("*unsupervised learning*"), in cui i campioni vengono raggruppati unicamente in funzione del profilo di espressione senza tenere conto di qualsiasi informazione a priori¹¹. Il metodo di analisi supervisionata è comunemente utilizzato per l'individuazione di geni che correlano con classi di malattia note (es.: il gene ZAP70 nelle LLC con geni V_H non mutati)⁵¹, mentre l'analisi non supervisionata è usata per la distinzione di entità clinico-patologiche (es.: il profilo genico differente del *Linfoma B-cellulare Mediastinico a grandi cellule* all'interno dei *Linfomi B-cellulari Diffusi a grandi cellule*)^{52,53} o l'identificazione di una nuova tassonomia basata sulla struttura di espressione genica di un gruppo di patologie (es.: gli studi di "arrays" applicati alle Leucemie Acute dimostrano come LAL e LAM con traslocazioni di MLL posseggano un profilo di

espressione genica simile tale da poterle considerare una classe di malattia omogenea)^{54,55}.

Conclusioni

Nonostante lo sviluppo di metodiche di analisi altamente sofisticate, lo studio del cariotipo rappresenta tuttora uno dei cardini della diagnostica oncoematologica. Lo studio del bandeggio dei cromosomi, correttamente interpretato, affiancato alla valutazione morfologica degli elementi patologici e ad una corretta valutazione dell'immunofenotipo, risulta infatti indispensabile per l'identificazione di molte entità clinico-patologiche. Inoltre, esso fornisce informazioni indispensabili circa l'inquadramento prognostico ed il tipo di approccio terapeutico da utilizzare in ogni singolo caso. L'approfondimento con studi di citogenetica molecolare (FISH e PCR) ha inoltre rappresentato un utilissimo strumento per il monitoraggio della risposta alla terapia e della malattia minima residua in gran parte delle malattie oncoematologiche (LLC, Leucemie Acute). I numerosi recenti studi nell'ambito della genomica hanno dato risultati incoraggianti e talvolta molto importanti per la caratterizzazione di entità patologiche critiche (es.: LLC). Nonostante questo, la complessità della validazione dei risultati in questi casi, i costi e la riproducibilità rappresentano ancora grossi ostacoli all'introduzione di queste metodiche nella routine clinica. **T.M.**

Bibliografia

1. Wang N. Cytogenetics and molecular genetics of ovarian cancer. *Am J Med Genet.* 2002; 115:157-163.
2. Fleischman EW, Prigogina EL. Karyotype peculiarities of malignant lymphomas. *Hum Genet* 1977; 35:269-279.
3. Rowley JD. Chromosome studies in malignant lymphoma. In: Levy R, Kaplan KS (eds): *Malignant Lymphoma*. UICC Technical report series 1978; 37-71
4. Gahrton G, Robert KH, Friberg K, et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by

- polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood* 1980; 56:640-7.
5. **Gahrton G, Robert KH, Friberg K, et al.** Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1980;1:146-147.
 6. **Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al.** Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; 323:720-724.
 7. **Stilgenbauer S, Lichter P, Dohner H.** Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4:48-72.
 8. **Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al.** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343:1910-1916.
 9. **Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, et al.** Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 1993; 4:41-46.
 10. **Liehr T, Starke H, Weise A, et al.** Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol* 2004;19:229-237.
 11. **Ebert BL, Golub TR.** Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood*. 2004; 104:923-932.
 12. **Baikie AG, Court-Brown WM, Buckton KE, et al.** A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1960; 188:1165-6.
 13. **Rowley JD.** Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-293.
 14. **Sokal JE.** Prognosis in chronic myeloid leukaemia: biology of the disease vs. treatment. *Baillieres Clin Haematol* 1987; 1:907-929.
 15. **Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al.** Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2:561-566.
 16. **Goldman JM, Melo JV.** Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1084-1086.
 17. **Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al.** Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344:1038-1042.
 18. **Rosti G, Martinelli G, Bassi S, et al;** Study Committee, Italian Cooperative Study Group for Chronic Myeloid Leukemia; Writing Committee, Italian Cooperative Study Group for Chronic Myeloid Leukemia. Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:2284-2290.
 19. **Sokal G, Michaux JL, Van Den Berghe H, et al.** A new hematologic syndrome with a distinct karyotype: the 5 q—chromosome. *Blood* 1975; 46:519-533.
 20. **Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al.** The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999; 10:1419-1432.
 21. **Velloso ER, Michaux L, Ferrant A, et al.** Deletions of the long arm of chromosome 7 in myeloid disorders: loss of band 7q32 implies worst prognosis. *Br J Haematol* 1996; 92:574-581.
 22. **Ghione F, Mecucci C, Van den Berghe H.** Chromosome 7 deletion present at diagnosis in Ph1 negative CML. *Haematologica* 1985; 70:242-244.
 23. **Kere J, Ruutu T, de la Chapelle A.** Monosomy 7 in granulocytes and monocytes in myelodysplastic syndrome. *N Engl J Med* 1987; 316:499-503.
 24. **Campbell LJ, Garson OM.** The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. *Leukemia* 1994; 8:67-71.
 25. **La Starza R, Wlodarska I, Aventin A, et al.** Molecular delineation of 13q deletion boundaries in 20 patients with myeloid malignancies. *Blood*. 1998; 91:231-237.
 26. **Jary L, Mossafa H, Fourcade C, et al.** The 17p-syndrome: a distinct myelodysplastic syndrome entity? *Leuk Lymphoma* 1997; 25:163-168.
 27. **Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, et al.** 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood* 1998; 91:1008-1015.
 28. **Beyer V, Castagne C, Muhlematter D, et al.** Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152:29-41.
 29. **Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al.** The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92:2322-2333.
 30. **Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, et al.** Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001; 15:1841-1847.
 31. **Van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, et al.** Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33:60-72.
 32. **Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al.** International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89:2079-2088.
 33. **Tricot GJ.** Prognostic factors in the myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 1992; 16:109-115.
 34. **Verhoef G, De Wolf-Peters C, Kerim S, et al.** Update on the prognostic implication of morphology, histology, and karyotype in primary myelodysplastic syndromes. *Hematol Pathol* 1991; 5:163-175.

35. **Tricot G, Mecucci C, Van den Berghe H.** Evolution of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1986; 63:609-614.
36. **Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, et al.** Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998; 58:4173-4179.
37. **Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al;** Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100:4325-4336.
38. **Frohling S, Skelin S, Liebisch C, et al;** Acute Myeloid Leukemia Study Group, Ulm. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:2480-2485.
39. **Cox MC, Panetta P, Venditti A, et al.** Comparison between conventional banding analysis and FISH screening with an AML-specific set of probes in 260 patients. *Hematol J* 2003; 4:263-270.
40. **Mrozek K, Prior TW, Edwards C, et al.** Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Clin Oncol* 2001; 19:2482-2492.
41. **Klaus M, Haferlach T, Schnittger S, et al.** Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 155:47-56.
42. **Birg F, Courcoul M, Rosnet O, et al.** Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 1992; 80:2584-2593.
43. **Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al.** Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93:3074-3080.
44. **Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al;** GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352:254-266.
45. **Cuneo A, Bigoni R, Cavazzini F, et al.** Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia* 2002; 16:1745-1751.
46. **Pui CH, Relling MV, Downing JR.** Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350:1535-1548.
47. **Le Bien TW.** Fate of human B-cell precursors. *Blood* 2000; 96: 9-23
48. **Klein U, Goossens T, Fischer M, et al.** Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological reviews* 1998; 162:261-280.
49. **Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M.** Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-815.
50. **Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al.** Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94:1848-1854.
51. **Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al.** ZAP 70 expression identifies a chronic lymphocytic subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101:4944-4951.
52. **Savage K, Monti S, Kutok J, et al.** The molecular signature of mediastinal large B cell lymphoma differs from that of other diffuse large B cell lymphoma and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102:3871-3879.
53. **Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al.** Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favourable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; 198:851-862.
54. **Yeoh E, Ross M, Shurtleff S, et al.** Classification, subtype discovery and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukaemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1:133-143
55. **Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al.** Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350:1605-1616.