



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE**

CICLO XXXI

*Studio longitudinale mediante FISH e significato prognostico
dell'eterogeneità genetica intratumorale nella Leucemia Linfatica Cronica*

*FISH longitudinal study and prognostic value of intratumoral genetic
heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia*

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Carlo Ferrari

Tutore:

Chiar.mo Prof. Federico Quaini

Dottoranda: Tania Maldacena

Anni 2015/2018

*“We used to think that our fate was in our stars.
Now we know that, in large measure, our fate is in our genes”
(James Watson)*

Indice

Summary	3
1.INTRODUZIONE	5
1.1 Lo stato dell'arte.....	5
1.2 Epidemiologia.....	7
1.3 Fattori eziologici.....	7
1.4 Patogenesi.....	7
1.4.1 Prime ipotesi e nuove ipotesi sull'origine della LLC	7
1.4.2 Microambiente.....	10
1.5 Criteri Diagnostici	11
1.5.1 Morfologia.....	12
1.5.2 Immunofenotipo	13
1.6 Analisi aggiuntive.....	14
1.7 Fattori Prognostici	15
1.7.1 Stadiazione RAI e BINET	16
1.7.2 Marcatori sierici della massa tumorale	17
1.7.3 Marker proteici	17
1.7.4 Fattori citogenetici e molecolari	19
1.7.5 Fattori prognostici molecolari	25
1.7.6 Mutazioni epigenetiche.....	31
1.7.7 L'espressione dell'enzima telomerasi e la lunghezza dei telomeri nelle cellule leucemiche di LLC.	33
1.8 Anomalie citogenetiche rilevate mediante microarrays	34
1.9 Ruolo delle NGS nel <i>setting</i> clinico della LLC	37
1.10 Evoluzione clonale nella LLC	38
1.11 Cenni Terapia	40
1.12. Panorama degli schemi prognostici proposti.....	44
2.SCOPO DELLA TESI	48
2.1 PROGETTO 1	48
2.2 PROGETTO 2	49
3.MATERIALI E METODI	50

3.1 MATERIALI	50
3.1.1 Descrizione dei pazienti: PROGETTO 1	50
3.1.2 Descrizione dei pazienti: PROGETTO 2	50
3. METODI	52
3.2.1 Dalla Citogenetica alla Citogenomica	52
3.2.2 Citogenetica Classica	53
3.2.3 Citogenetica molecolare	55
3.3 ANALISI STATISTICA	72
4. RISULTATI	73
4.1.1 Analisi Citogenetica Convenzionale (CC) e FISH	73
4.1.1 CNVs analisi: confronto tra metodi	75
4.1.2 ANOMALIE AGGIUNTIVE RIVENUTE MEDIANTE aCGH + SNP array E LPS	81
4.2 Progetto 2	83
4.2.1 Risultati analisi Citogenetica Convenzionale (CC) e FISH	83
4.2.2 Risultati: Validazione del nuovo modello prognostico	90
4.2.3 Risultati studio longitudinale	93
5. DISCUSSIONE	99
5.1 PROGETTO 1	99
5.2 PROGETTO 2	105
6. CONCLUSIONI	114
6.1 Progetto 1	114
6.2 Progetto 2	115
Ringraziamenti	117
Bibliografia	118

Summary

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukemia of the Western world and it is characterized by an extreme clinical and biological heterogeneity. In view of this extraordinary heterogeneity, several research groups are focused on finding the best prognostic algorithm for the patients' stratification. Until now, none has universally adopted. Although a plethora of prognostic indices have been proposed, the four cytogenetic abnormalities detected by Fluorescent In Situ Hybridation (FISH) are considered highly powerful prognostic markers [in descending order of adversity: del(17p), del(11q), trisomy 12, no aberrations, and del(13q)]. The hierarchal Dohner classification, based on these four abnormalities and developed more than 15 years ago, is still widely used in the clinical routine. However, the prognosis of each current cytogenetic risk group remains heterogeneous; and the coexistence of multiple and different subclones, also known as Intratumoral Genetic Heterogeneity (ITH), may contribute to this nonuniformity. In addition, the genome wide techniques has identified additional cytogenetic recurrent abnormalities with potentially clinicopathologic relevance. The current diagnostic approaches, FISH and Conventional Cytogenetic (CC), could understate the LLC complexity.

First, our purpose was to compare the abnormalities detection rate of three different cytogenetic methods [Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA), array comparative genomic hybridization plus Single Nucleotide Polymorphism arrays (aCGH+SNP array) and a novel Next Generation Sequencing-based molecular karyotyping technique] with the current routinely used approaches. The goal was to evaluate the best approach for the routine CLL diagnostic setting, to overcome the limitations of FISH (a targeted test that provides a limited view on the genomic landscape) and CC (a test with low resolution). Next, we aimed to validate a novel prognostic algorithm that integrated the number and the co-occurrence of recurrent cytogenetic abnormalities and the size of intratumoral genetic subclones. In addition, we performed a longitudinal study for 52 patients with sequential samples (at diagnosis, pre-therapy, and follow up) to track the clonal evolution, particularly in relation to therapy and the course of the disease. To get insights into clonal composition, we performed an in-depth molecular cytogenetic analysis by means of two-colour probe sets.

Methods: For the first purpose, performed in collaboration with the Center of Human Genetics of General Hospital of Leuven (BE), we collected peripheral blood (PB) samples from 10 CLL patients. All patients were analyzed by R-banding after short-term culture. We performed a FISH analysis, using commercially available probes [(LSI RB1(SG)/D13S319(SO), XL DLEU/LAMP/12CEN and XL ATM/TP53 probe set (cut-off: 5%)], MLPA analysis using a SALSA MLPA P038-A2 CLL kit designed by MRC-Holland, CytoSure Haematological Cancer + SNP Array (8x60k) platform and a novel, cost-effective NGS-based karyotyping, which allows a multiplex sequencing (14-18 samples per lane) with low coverage (0.17x and $\sim 12 \times 10^6$ reads for sample) but with high-resolution of whole-genome.

Next, to validate the novel algorithm we analyzed 105 patients at diagnosis and/or before starting treatment by Q-banding analysis and FISH with a standard panel probes: XL DLEU/LAMP/12CEN and XL ATM/TP53. We distinguished a major or minor clone, if the difference between two coexistent abnormalities in each patient was $>30\%$. Patients were then stratified in three groups (favorable, neutral, adverse) on the basis of the current and novel prognostic model. Overall survival (OS) and Time to First Treatment (TTFT) were assessed by Kaplan Maier method and the prognostic features were evaluated by log-rank test ($p < 0.05$) with a median follow-up of 69 months.

Aim I results: Overall, a total of 28 copy number variations (CNV) was detected by a combination of all the techniques, excluding karyotype. We demonstrated that FISH analysis underestimated the genomic complexity in CLL and the MLPA test was not a robust tool for the CLL clinical setting, owing to its low sensitivity. The genome wide analysis, performed by aCGH + SNP array and by NGS-based karyotyping, showed the highest abnormality detection rate revealing additional genomic lesions (39%) with good statistical concordance compared to FISH-detectable CNV. The novel NGS-based karyotyping against to aCGH + SNP array showed high sensitivity and cost-effective advantages. However, this promising approach does not detect, the copy neutral loss of heterozygosity (CN-LOH), a novel abnormality with probable prognostic impact. The combination of aCGH and SNP array is the only approach for detection of CN-LOH. In our cohort, two cases with 11q14.3q22.3 and 20q11.21q14 CN-LOH were detected.

Aim II Results: At diagnosis, Q-banding analysis showed 37% of abnormal karyotype (19/51) with 31% (6/11) of complex karyotype (CK) (≥ 3 abs). During follow up, Q-banding analysis was performed in 19 patients: 58% (11/19) with abnormal karyotype and six of them with CK.

In 87% of the patients at least one FISH abnormality was detected as follows: a single, two, three, four aberrations in 40 (46%), 33 (38%), 12 (14%) and 2 (1,9%) patients, respectively. Based on this data, in combination with the clone size, we stratified patients into favorable, neutral and adverse groups of the current and new model respectively. Out of 105 patients, 12% of them were re-stratified. Surprisingly, a statistically significant difference in OS ($p < 0.05$) among the three groups was observed only by adopting the novel model. In addition, the in-depth FISH analysis on clonal composition allowed us to discriminate between monoclonal (47%) and ITH patients (17%) and to define different clonal dynamics: clonal size reduction, clonal stability, clonal equilibrium, clonal imbalance. The longitudinal study showed clonal evolution (CE) in 25% of the patients and del(17p) and monosomy 12 were the most frequent aberrations acquired at follow up. Although the CE was more associated with clinical progression, it appeared in untreated patients with clinical stability, as well. In ITH patients the therapy, especially chemotherapy exposure, could destroy the clonal equilibrium between different clones, promoting the expansion of the highly fit clone. In our study, there was no association between presence of baseline cytogenetic abnormalities and CE. Finally, patients with clonal evolution showed a short TTFT but the OS was comparable with patients without CE.

Conclusion: Our study revealed NGS-based karyotyping could complement the current diagnostic techniques, but FISH analysis remains a powerful tool in the clinical CLL setting, especially due to its high sensitivity and its ability to study a single cell, allowing for the evaluation of emerging subclones. Moreover, the prognostic value of novel chromosomal abnormalities has not been clearly revealed. For these reasons, until now, FISH and CC could not completely be replaced for CLL diagnosis and stratification. Further studies are needed to establish a standard criteria for future clinical applicability of NGS karyotyping.

In addition, we confirmed that the CK detected by Q-banding was a poor prognosis marker. We demonstrated that the high-risk cytogenetic abnormality as a minor clone showed a favorable clinical course and the new stratification algorithm, including ITH, was superior to the conventional model in predicting survival and the TTFT in patients with CLL. Finally, the longitudinal study showed that CE was a common finding in patients with CLL. Moreover the chemotherapy exposure frequently resulted in marked clonal evolution. Our results highlight the need of sequential FISH analysis in patients with CLL even in absence of treatment because we found the onset of clone with del(17p) even in untreated patient. Further longitudinal study are needed to define the association between clonal dynamics and the clinical status, to track the evolutionary trajectories and to shed light on the relevant genetic events which occur over the course of the disease that can explain treatment resistance and a short outcome. In conclusion, searching for ITH at diagnosis and/or at the time of first treatment could predict clonal evolution and the generation of therapy-resistant subclones.

1. INTRODUZIONE

1.1 Lo stato dell'arte

La leucemia linfatica cronica (LLC) è un disordine linfoproliferativo cronico di natura clonale che coinvolge le cellule B CD5⁺. E' caratterizzata dall'espansione clonale e dall'accumulo di linfociti di piccola taglia apparentemente maturi, nel sangue periferico (SP), nel midollo osseo (BM, Bone Marrow) e nei tessuti linfoidei secondari o più raramente in sedi extralinfatiche. Conseguentemente può verificarsi linfocitosi, splenomegalia, linfadenopatia ed infiltrazione di cellule leucemiche nel midollo (Kipps et al., *Nat Rev Dis Primers*, 2017).

La prima definizione di LLC, fornita dal National Cancer Institute Working Group, risale al 1996 e fu modificata, dopo circa dieci anni, nel 2008, dall'International Workshop on CLL (IW-CLL) (Strati P. et al. *Mayo Clin Proc*, 2018). Sulla base delle linee guida IW-CLL 2008, la LLC è definita nella vigente classificazione delle neoplasie ematologiche (WHO, World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, con ultima revisione nel 2016), come segue:

“Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) is a neoplasm composed of monomorphic small, round to slightly irregular B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow, spleen and lymph nodes, admixed with prolymphocytes and paraimmunoblasts forming proliferation centres in tissue infiltrates.”

La LLC viene, dunque, classificata tra i tumori dei tessuti linfoidei a cellule B mature (Tab. 1) ed è definita come linfoma leucemico linfocitico distinguibile dal linfoma a piccoli linfociti (SLL) solo per la sua manifestazione leucemica. Pertanto il sottogruppo SLL include solo quelle entità, che sebbene non leucemiche, (<5x10³/uL di CLL-cells nel SP) mostrano morfologia tissutale ed immuno-fenotipo LLC-simile (Swerdlow S.H. et al., *Blood*. 2016) (Campo E. et al., *Blood*. 2011).

Mature B-cell neoplasms

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable*
Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*
Hairy cell leukemia variant*
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenstrom macroglobulinemia
Heavy chain diseases
α Heavy chain disease
γ heavy chain disease
μ heavy chain disease
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
Pediatric nodal marginal zone lymphoma *
Follicular lymphoma
Pediatric follicular lymphoma*
Primary cutaneous follicle centre lymphoma
Mantle cell lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV-positive DLBCL of the elderly*
DLBCL associated granulomatosis
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK-positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
Primary effusion lymphoma
Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

Tabella 1. Classificazione WHO delle neoplasie linfoidi (Swerdlow S.H. et al., *Blood* 2016). *Abbreviazioni:* NOS, Not otherwise specified. *entità provvisorie per le quali secondo la WHO Working Group mancano evidenze per definirle entità ematologiche specifiche.

1.2 Epidemiologia

La LLC è il sottotipo leucemico più frequentemente diagnosticato nella popolazione caucasica, prevalentemente nel sesso maschile, rappresentando da sola circa il 40% di tutte le leucemie dell'adulto (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016), con un'incidenza di 4,3 nuovi casi ogni 100.000 individui per anno (Howlader et al, SEER Cancer Statistics Review, 2011-2015, National Cancer Institute). Risulta invece rara in Asia e soprattutto in Giappone rappresentando solo il 3% delle leucemie dell'adulto. Le basi di questa differenza etnica e geografica non sono ad oggi chiare ma sembrerebbero suggerire una notevole suscettibilità genetica. Difatti il ridotto rischio di sviluppare la LLC non cambia nei gruppi etnici a basso rischio che nascono e/o risiedono nel mondo occidentale (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). Sebbene tale neoplasia colpisca maggiormente gli anziani (età media alla diagnosi compresa fra 67 ed i 72 anni) è stato stimato che circa il 10% di nuovi casi viene diagnosticato prima dei 55 anni, probabilmente grazie alla sempre più frequente esecuzione di controlli emocromocitometrici che consentono di individuare la patologia in fase precoce tipicamente asintomatica (Baliakas P. et al., *J Intern Med*. 2016).

1.3 Fattori eziologici

L'eziologia non è nota. Gli unici fattori di rischio, riportati in letteratura, sono: età avanzata, razza caucasica ed anamnesi familiare positiva per lo sviluppo di LLC (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). In particolare, i fattori genetici, rispetto a quelli ambientali, incidano maggiormente sulla patogenesi della LLC. Tale evidenza è dimostrata sia dalla notevole disparità etnica, essendo molto frequente nei paesi occidentali e quasi rara in Asia ed Africa, ma anche dalla documentata suscettibilità familiare: i parenti di primo grado di pazienti con LLC hanno una probabilità otto volte maggiore, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare la neoplasia. È presente inoltre il caratteristico fenomeno dell'anticipazione: esistono famiglie in cui la malattia appare in generazioni successive ad una età sempre più precoce (Goldin et al, *Haematologica* 2009). Poiché l'outcome clinico ed il fenotipo delle LLC familiari e sporadiche è indistinguibile, si ritiene che le due forme condividano lo stesso meccanismo patogenetico (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

1.4 Patogenesi

1.4.1 Prime ipotesi e nuove ipotesi sull'origine della LLC

Per molti anni la LLC è stata descritta come una patologia statica causata da un accumulo passivo di linfociti leucemici, caratterizzati da uno stato di quiescenza, da un basso indice proliferativo e da una prolungata sopravvivenza. Tale teoria si basava sull'evidenza che le cellule di LLC, isolate dal SP dei pazienti,

generalmente si trovano nelle fasi G₀ e G₁ del ciclo cellulare. Difetti nel meccanismo apoptotico sembravano, pertanto, essere uno dei principali meccanismi della patogenesi di LLC (Ringshausen *et al*, Blood 2002).

Successivamente questa prima teoria è stata smentita da studi di misurazione *in vivo* della cinetica cellulare dei linfociti anomali che hanno dimostrato l'esistenza di una piccola porzione di cellule attivamente proliferanti, con circa il 2% di nuove cellule generate ogni giorno (Messmer *et al*, *J Clin Invest* 2005). Nonostante queste nuove scoperte, l'origine della LLC è ancora argomento di dibattito (Chiorazzi *et al.*, *Blood* 2011). Sebbene sia una neoplasia delle cellule B mature è ormai accettata l'idea che le prime anomalie potrebbero essere acquisite dalle cellule staminali emopoietiche (CSE). Infatti, alterazioni genetiche tipiche della LLC come trisomia 12, del(13q), mutazioni in *SF3B1*, *NOTCH1*, e *XPO1* sono state ritrovate nei progenitori emopoietici di alcuni pazienti (Xose P. *et al* *Blood* 2018) (Roos-Weil *et al.*, *Am J Hematol* 2016). Anche esperimenti murini dimostrano che trapiantando le CSE di pazienti affetti da LLC in topi immunodeficienti non solo esse attecchiscono ma possono essere responsabili di una proliferazione B clonale (Kikushige Y. *et al.*, *Cancer Cell* 2011). Dunque sembrerebbe che il primo evento mutazionale, genetico e/o epigenetico, avvenga nel progenitore staminale totipotente, e nel caso in cui esso proceda verso la differenziazione linfoide potrebbe dare origine ad una cellula staminale "LLC". Le anomalie genetiche nel progenitore staminale potrebbero determinare l'espansione policlonale di progenitori B cellulari, che in seguito all'interazione con l'antigene potrebbero andare incontro ai meccanismi di attivazione B cellulare, o mediati dalle cellule T helper (T_H) nei centri germinativi, oppure in modo T_H indipendente, fuori dai centri germinativi e quindi senza essere sottoposti all'ipermutazione somatica dei geni *IGHV* (Immunoglobulin heavy-chain variable gene). Successivamente la stimolazione antigenica determinerebbe la selezione di cellule B mature generando una popolazione oligoclonale in cui potrebbero accumularsi altre alterazioni genetiche determinando inizialmente la linfocitosi monoclonale B (MBL), che rappresenta lo stadio pre-leucemico della LLC, e successivamente, l'acquisizione di ulteriori anomalie che potrebbe essere responsabile della malattia conclamata (Fig. 1) (Fabbri *et al.*, *Nat Rev Cancer*. 2016).

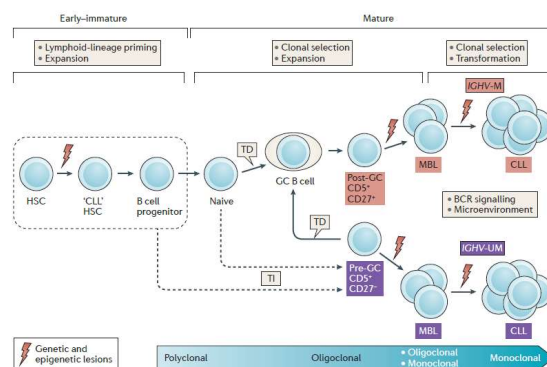


Figura 1 Origine della LLC (Fabbri *et al.* *Nat Rev Cancer*. 2016).

I meccanismi che fanno da ponte tra le anomalie iniziali e l'espansione clonale non sono ancora chiari ma analisi immunogenetiche del recettore delle cellule B (BCR, B cell receptor) mostrano fortemente che la selezione antigenica potrebbe svolgere un ruolo importante in tale contesto (Xose P. et al *Blood* 2018). Recenti ricerche hanno svelato che nella LLC il BCR è legato ad autoantigeni responsabili di una stimolazione costitutiva del recettore. L'importanza di tale fenomeno è dimostrata dal successo terapeutico degli inibitori chinasi che bloccano il *signaling* del BCR (Kipps et al., *Nat Rev Dis Primers*, 2017). Inoltre, le cellule di LLC in seguito all'attivazione del BCR possono andare incontro o ad una risposta di tipo attivante oppure possono andare incontro ad una condizione anergia o addirittura ad uno status non responsivo (Xose P. et al *Blood* 2018). Questa diversa risposta è di notevole rilevanza poiché non solo determina un diverso comportamento dell'emopatia, ma ha anche un impatto diverso sull'*outcome* clinico. Infatti, l'aumento dell'attivazione delle cellule B è più frequente nelle LLC in cui i geni *IGHV* non sono mutati (UM-LLC), mentre l'anergia predomina nelle LLC con *IGHV* mutato (M-LLC). L'anergia è uno stato di letargo cellulare indotto dal legame cronico del BCR con gli antigeni, in assenza di interazione con le cellule T_H, pertanto l'attivazione cellulare viene bloccata. Poiché lo status di anergia determina una minore capacità proliferativa, in risposta all'attivazione del BCR, tale fenomeno potrebbe, in parte, spiegare il motivo per il quale le LLC con *IgHV* mutato mostrano un andamento indolente rispetto ai casi con *IgHV* non mutato (Kipps et al., *Nat Rev Dis Primers*, 2017) (Xose P. et al *Blood* 2018). Poiché le UM-LLC (60-65% dei casi) e le M-LLC (35-40% dei casi) presentano caratteristiche clinico-biologiche diverse è stata avanzata l'ipotesi che le cellule di LLC possano originarsi da due progenitori distinti: in un caso da cellule B attivate nei centri germinativi mediante i T_H ed in un secondo caso da cellule B esposte all'antigene fuori dai centri germinativi e quindi senza essere sottoposte al fenomeno dell'ipermutazione somatica (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

Successivamente, studi del profilo di espressione genico (GEP) hanno definitivamente dimostrando che nel caso delle M-LLC la cellula neoplastica d'origine deriva da cellule B della memoria CD5⁺ CD27⁺ post-centro germinativo, che sono trascrizionalmente simili alle cellule B di memoria e molto probabilmente derivano da cellule B CD5⁺CD27⁻ sottoposte ai fenomeni di maturazione nei centri germinativi; mentre nel caso delle UM-LLC, la cellula d'origine deriva da cellule B CD5⁺ CD27⁻ pre-centro germinativo che potrebbe derivare da cellule B naive oppure da un *lineage* separato di precursori B cellulari (Xose P. et al *Blood* 2018). Tale ipotesi è stata ulteriormente avvalorata da recenti studi epigenetici che hanno rilevato nelle cellule M-LLC una *signature* tipica delle cellule post-centro germinativo (memory-like) mentre le cellule UM-LLC mantengono una *signature* epigenetica naive-like, quindi pre-centro germinativo. Inoltre, tali studi hanno rilevato anche la presenza di un terzo sottotipo epigenetico che mostra una *signature* intermedia tra la naive e la memory-like. Ciò suggerisce che tale cellula potrebbe originarsi da una cellula B normale non ancora identificata (Xose P. et al *Blood* 2018).

Un'ultima importante considerazione è che le cellule LLC mostrano una particolare propensione nell'uso di alcuni geni *IGHV* rispetto alle cellule B normali. Difatti, è stata dimostrata, in alcuni casi, un'identica o

quasi identica sequenza amminoacidica “delle regioni determinante complementarietà 3” (CDR3), ovvero porzioni del BCR coinvolte nel riconoscimento antigenico ed altamente variabili. Tale considerazione ha condotto al concetto del cosiddetto “**recettore stereotipato**”. La somiglianza nella composizione del BCR rilevata in pazienti affetti da LLC, appartenenti anche ad aree geograficamente lontane, costituisce una peculiarità unica di questa malattia. Il fenomeno della stereotipia presenta implicazioni patogenetiche importanti, dal momento che supporta l’ipotesi relativa all’esistenza di un insieme di antigeni o classi di epitopi strutturalmente simili con un ruolo primario nella selezione/espansione del clone B leucemico. Inoltre, l’espressione di BCR stereotipati appare più frequente in pazienti di UM-LLC, osservato nel 40% dei casi, rispetto ai casi M-LLC, evidente solo nel 10% (Xose P. et al *Blood* 2018) (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). Alcuni di questi stereotipi sono associati a particolari alterazioni genomiche e caratteristiche cliniche, suggerendo che l’origine immunogenetica potrebbe essere un importante determinante nella biologia della LLC (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

1.4.2 Microambiente

Partendo dall’osservazione che *in vitro* le cellule di LLC vanno generalmente incontro ad un’apoptosi spontanea, si è ipotizzato che il microambiente svolga un ruolo cruciale per la sopravvivenza e proliferazione delle cellule di LLC *in vivo* (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). Difatti, le cellule neoplastiche migrano continuamente dal sangue periferico ai linfonodi e/o al midollo attratte da un gradiente di chemochine. Principalmente la migrazione è mediata dalle chemochine CXCR4 secrete dalle cellule simil-nutrici (nurse-like, NLCs) e dalle chemochine CCL19 e CCL21 secrete dalle cellule endoteliali delle venule ad endotelio alto (HEV) (Fig. 2). Una volta nel tessuto linfonodale, le cellule di LLC formano un “centro proliferativo” in contrapposizione al fisiologico centro germinativo (Kipps et al., *Nat Rev Dis Primers*, 2017). All’interno di questi centri proliferativi le cellule neoplastiche entrano in contatto diretto con le cellule del microambiente che secernendo diverse chemochine (es. la chemochina CXCL12, il fattore di attivazione delle cellule B, BAFF) favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule maligne (es. mediante la molecola APRIL, anche conosciuta come TNFS13). Si viene in tal modo a formare il microambiente tumorale, meno organizzato rispetto al microambiente linfonodale (Xose P. et al *Blood* 2018).

L’interazione tra le cellule LLC e tutte le altre cellule del microambiente tumorale, ossia cellule stromali, le cellule nurse-like (anche conosciute come macrofagi linfoma-associati), cellule T, cellule mesenchimali e cellule follicolari dendritiche (FDC), è mediato da un complesso network di molecole di adesione, ligandi di superficie, chemochine, citochine e dei loro rispettivi recettori (Fig. 2). Inoltre le cellule di LLC attivate dalle cellule nurse-like o dalla stimolazione del BCR, iniziano a secernere chemochine (CLL3, CLL4, CLL12 e CLL22) che richiamano nel microambiente midollare cellule T ed altre cellule stromali. A sua volta

le cellule T attivate possono fornire alle cellule di LLC segnali di proliferativi mediante il legame tra il recettore CD40 ed il ligando CD40L espresso sulla superficie delle cellule T.

Anche la componente vascolare della nicchia tumorale viene alterata dall'interazione con le cellule leucemiche. Infatti, diversi studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità delle cellule LLC di aumentare la densità dei micro-vasi, attraverso la secrezione paracrina di citochine angiogeniche (ad esempio VEGF, bFGF, TSP-1) (Xose P. et al *Blood* 2018).

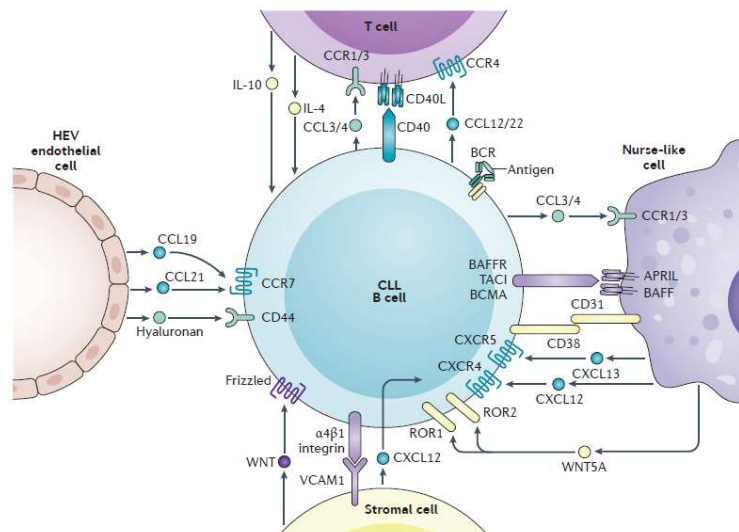


Figura 2 Microambiente tumorale in cui si localizzano le cellule di LLC. Abbrev.: CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4), CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12), nurse-like cells (NLCs), CC-chemokine receptor 7 (CCR7), CC-chemokine ligand 19 (CCL19) e CCL21, high endothelial venules (HEVs), B cell-activating factor (BAFF; also known as TNFSF13B), proliferation-inducing ligand (APRIL; anche nota come TNFSF13), vascular cell adhesion protein 1 (VCAM1)- $\alpha 4\beta 1$ integrin, BAFFR, BAFF receptor (also known as TNFRSF13C); BCMA, B cell maturation protein (also known as TNFRSF17); BCR, B cell receptor; TACI, transmembrane activator and CAML interactor (also known as TNFRSF13B) (Kipps et al., *Nat Rev Dis Primers*, 2017)

Complessivamente gli esperimenti eseguiti *in vitro* suggeriscono che il microambiente tumorale, con tutte le interazioni sopra descritte, possa giocare un ruolo determinante nella resistenza delle cellule LLC all'apoptosi, favorendo la sopravvivenza cellulare alla chemioterapia e quindi inducendo chemio refrattarietà (Xose P. et al *Blood* 2018).

1.5 Criteri Diagnostici

Inizialmente il criterio diagnostico per la LLC era rappresentato da una linfocitosi cronica assoluta $> 5.0 \times 10^9/L$ di linfociti. Successivamente l'utilizzo di tecniche immunofenotipiche sempre più sensibili ha rivelato in soggetti sani una notevole incidenza di proliferazione di cellule linfoidi monoclonali con immunofenotipo aberrante. Tale osservazione ha portato l'“*International Workshop on CLL*” (IW-CLL) ha proporre nuovi criteri diagnostici per la diagnosi di LLC. Ad oggi, la diagnosi di LLC richiede la

presenza continuata per almeno tre mesi di una conta assoluta maggiore $5.0 \times 10^3/\mu\text{l}$ nel sangue periferico di linfociti B clonali. La clonalità viene confermata mediante analisi immunofenotipica dimostrando la restrizione della catena leggera delle Ig (Ig con catena leggera di un unico tipo: solo kappa o solo lambda) (Hallek M., *Blood* 2008).

Nel caso di un valore inferiore di linfociti B clonali in individui apparentemente sani, possono essere presenti due condizioni: la prima è il linfoma a piccoli linfociti (*Small Lymphocytic Lymphoma* - SLL), caratterizzata da linfadenopatia e assenza di citopenia causata da infiltrazione midollare; la seconda è la linfocitosi B monoclonale (*Monoclonal B-cell Lymphocytosis* - MBL), in cui i valori di linfociti B-clonali nel sangue sono persistenti nel tempo ma sono inferiori a $5,000/\mu\text{l}$, con immunofenotipo uguale a quello di LLC e con assenza di altri segni di linfoma, come linfadenopatie (<1.5 cm), organomegalia, citopenie e di sintomi correlabili alla LLC. La MBL è considerata la forma preleucemica di LLC, il tasso di progressione alla condizione leucemica conclamata è di 1-2% di pazienti per anno. Tale condizione è riscontrata frequentemente nei parenti di primo grado di pazienti affetti da LLC e nel 5% di soggetti con età superiore ai 60 anni. L'incidenza aumenta del 14% nei soggetti con linfocitosi (Ghia et al., *Blood* 2004).

La presenza di citopenia causata da infiltrazione midollare è determinante per la diagnosi di LLC a prescindere dal numero di linfociti monoclonali o di coinvolgimento linfonodale (Hallek M. et al., *Blood* 2008).

Oltre all'esame emocitometrico, la diagnosi di LLC si basa sull'analisi morfologica, immunofenotipica ed in alcuni casi anche l'esame genetico delle cellule linfoidi circolanti.

1.5.1 Morfologia

Le cellule leucemiche osservate allo striscio periferico appaiono come linfociti di piccole dimensioni ed aspetto maturo, con citoplasma scarso pallido o lievemente basofilo, con cromatina nucleare parzialmente addensata e con nucleo denso senza nucleoli distinguibili. Inoltre le cellule di LLC sono caratterizzate dalle cosiddette "ombre di Gumprecht" (*smudge cells*), considerate patognomiche per tale disordine (Hallek M., *Blood* 2008). Si presentano come delle vere e proprie macchie sulle cellule, ma in realtà rappresentano i frammenti di linfociti patologici che durante le manovre di l'allestimento del vetrino tendono facilmente a rompersi a causa della loro intrinseca fragilità, dovuta alla quasi totale assenza di vimentina, la principale proteina citoscheletrica (Strati P. et al., *Blood* 2015) (Fig. 3).

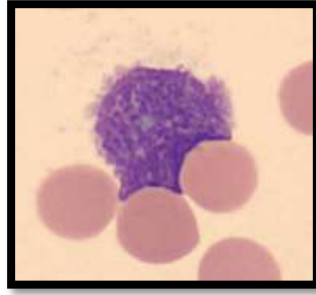


Figura 3 Smudge cell con colorazione Wriigh-Giemsa (Kipps et al., *Nat Rev Dis Primers*, 2017).

In rari casi l'analisi morfologica può rivelare la presenza di un numero variabile di blasti di grandi dimensioni con cromatina irregolare, diversi nucleoli e citoplasma basofilo, insieme ai piccoli linfociti di LLC. Questa condizione può suggerire una trasformazione della malattia nella sindrome di Richter. In questi casi l'esame istologico del linfonodo è necessario per confermare la trasformazione (Hallek et al., *Blood* 2008).

Lo studio citologico o istologico del midollo osseo non è riportato come una procedura necessaria alla diagnosi nonostante l'infiltrazione linfocitaria di almeno 30% di tutte le cellule nucleate rappresenti un criterio diagnostico minimo. La valutazione del tessuto midollare diventa cruciale in caso di citopenia e quindi per stabilire se la causa sia unicamente da attribuire alla progressione della LLC o, in caso contrario, l'eziologia sia indipendente dalla leucemia. In questo caso la biopsia midollare può essere utile prima di iniziare una terapia con agenti citotossici. Nel 30% dei casi l'infiltrato leucemico a livello midollare assume una configurazione "diffusa" che si associa a quadri di LLC in stadi clinici avanzati e rappresenta di per sé un fattore prognostico negativo (Hallek et al., *Blood* 2008).

1.5.2 Immunofenotipo

L'esame immunofenotipico è indispensabile per porre diagnosi di LLC e per escludere altri disordini linfoproliferativi. Spesso tale analisi è usata anche per valutare la malattia minima residua post trattamento e per individuare marker prognostici (es. ZAP-70) (Matutes et al, *Best Pract Res Clin Haematol* 2010).

Secondo i criteri stabiliti dal IW-CLL l'immunofenotipo caratteristico della LLC è rappresentato da coespressione dell'antigene di superficie CD5, normalmente espresso dai linfociti T, con i marcatori B cellulari, ossia CD19, CD20 e CD23 (Hallek et al, *Blood* 2008). Nello specifico, il CD5 è patognomonico della LLC e consente la diagnosi differenziale con la leucemia a cellule capellute (HCL), il linfoma follicolare in fase leucemica (LF) ed il linfoma della zona marginale (MZL), tutte patologie caratterizzate dall'assenza del CD5 (Matutes et al, *Best Pract Res Clin Haematol* 2010). Inoltre, le Ig di superficie, generalmente IgM e/o IgD e, solo in un minor numero di casi, IgG o IgA appaiono debolmente espresse,

come anche i marker il CD20 e il CD79b, utili nella diagnosi differenziale con gli altri disordini linfoproliferativi nei quali questi antigeni sono fortemente espressi (Hallek et al., *Blood* 2008).

La clonalità della patologia viene identificata dalla restrizione della catena leggera delle immunoglobuline, poiché le cellule leucemiche esprimono in modo restrittivo solo una delle due catene leggere (κ o λ). In caso di conferma della natura monoclonale della linfocitosi, si applica lo score immunofenotipico di Matutes che valuta l'espressione di cinque diversi marcatori di superficie (sIg, CD5+, CD23+, CD22/CD79b, FMC7) conferendo ad ognuno di essi un punto o zero in caso contrario. Secondo questo score si definisce una LLC quando la somma finale è maggiore o uguale a 3.

1.6.1 Analisi aggiuntive

I test descritti di seguito non sono indispensabili per la diagnosi ma potrebbero essere utili ai fini prognostici, in aggiunta allo stadiazione clinica RAI e BINET, per definire il carico tumorale e nei casi dubbi per la diagnosi differenziale. Alcuni di questi test devono invece essere eseguiti sempre in caso di *trials* clinici, come riportato nelle linee guida IWCLL (Tab. 2). E'opportuno sottolineare che l'indicazione al trattamento dipende esclusivamente dallo *staging* clinico dei pazienti e dalla loro sintomatologia (Hallek et al *Blood* 2008). Tali esami diagnostici aggiuntivi sono rappresentati da: analisi citogenetica/FISH (Fluorescent In situ Hybriditation), analisi molecolare dello stato mutazione di *IGHV* e *TP53*, valutazione di alcuni maker sierici (LDH e β -2 microglobulina) ed immunofenotipici (CD38 e ZAP70) ed esame morfologico midollare.

Esame diagnostico	Pratica clinica	Trails clinici
Test per stabilire la diagnosi		
Conta assoluta ed differenziale dei linfociti	sempre	sempre
Immunofenotipo dei linfociti periferici	sempre	sempre
Valutazione prima del trattamento		
Anamnesi e Performance status (PS)	sempre	sempre
Conta assoluta ed differenziale dei linfociti	sempre	sempre
Aspirato e biopsia midollare	Quando clinicamente indicata (es. citopenia non chiara)	auspicabile
Marker sierici e test diretto antiglobulicico (TDC)	Sempre	Sempre
Radiografia toracica	Sempre	Sempre
Status di infezioni	Sempre	Sempre
Test addizionali prima del trattamento		
FISH su PB: del(13q),del(11q), del(17p), add(12)	Sempre	Sempre
Citogenetica convenzionale su PB (specifici mitogeni)	NGI	auspicabile
Mutazione di <i>TP53</i>	Sempre	Sempre
Stato mutazione di <i>IgHV</i>	Sempre	Sempre
β 2-microglobulina sierica	auspicabile	Sempre
CT di torace, addome e pelvi	NGI	auspicabile
MRI, PET	NGI	NGI
Ultrasound addominale *	possibile	NGI

Tabella 2 Valutazione baseline dei pazienti con LLC (linee guida IW-CLL). Abbreviazioni: NGI, non generalmente indicata; MRI, Imaging a risonanza magnetica; PET, Tomografia ad emissione di positroni; FISH, Fluorescent in Situ hybridization. *usata in alcuni paesi per monitorare linfadenopatie organomegalia (Hallek et al., Blood 2008).

1.7 Fattori Prognostici

L'estrema eterogeneità clinica e biologia della LLC, ha portato ad individuare negli anni numerosi marcatori prognostici che possono essere distinti in due grandi classi:

1) Marker clinici:

- stadiazione Rai e Binet (Rai K.R., et al., *Blood* 1975) (Binet J.L., *Cancer* 1981).
- il tempo di raddoppiamento dei linfociti (LTD), fortemente correlato all'aggressività della malattia e definito come il numero di mesi necessari per raddoppiare il numero assoluto dei linfociti. Un LTD breve (<12 mesi) è indice di un alto tasso proliferativo e quindi di una malattia più aggressiva. Rappresenta uno dei criteri determinanti per l'inizio del trattamento (Hallek et al, *Blood* 2008).
- Modalità di infiltrazione del midollo osseo (diffuso vs non diffuso): un *pattern* di infiltrazione diffuso si associa a una cattiva prognosi (Hallek et al, *Blood* 2008).

2) Marker Biologici:

- Marker sierici
- Marker immunofenotipici
- Stato mutazionale di IGHV
- Analisi citogenetica e FISH
- Marker molecolari (mutazioni di *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *BICRC3*).

1.7.1 Stadiazione RAI e BINET

Sia la stadiazione RAI che la stazione Binet si basano unicamente su un esame fisico e su test di laboratorio standard. Nel 1975 sulla base dei dati ematologici e di alcuni parametri clinici, Rai e collaboratori proposero un modello prognostico in cui pazienti venivano classificati in cinque classi prognostiche (Rai K.R., *Blood* 1975):

STADIO 0: pazienti caratterizzati unicamente da linfocitosi nel sangue periferico e/o nel midollo osseo (cellule linfoidi >30%), sopravvivenza media > 150 mesi

STADIO I: oltre alla linfocitosi, comparsa anche di linfo-adenomegalie palpabili in qualsiasi sito, sopravvivenza media 101 mesi.

STADIO II: oltre alle condizioni dello stadio II compare epatomegalia o splenomegalia, sopravvivenza media 71 mesi.

STADIO III: in caso di riscontro di anemia correlata alla malattia (livelli di emoglobina [Hb] <110 g/L [11g/dL]), sopravvivenza media 19 mesi.

STADIO IV: se compare oltre all'anemia anche piastrinopenia (conta di piastrine <100 x10⁹/L), sopravvivenza di 19 mesi.

Successivamente, Binet e collaboratori proposero un modello, concettualmente simile al modello di RAI, ma riducendo le classi prognostiche in soli tre gruppi, basandosi sul numero di aree coinvolte, ossia sul numero dei linfonodi ingrossati (diametro > 1 cm), sulla presenza di organomegalia, e sulla presenza/assenza di anemia e/o trombocitopenia. Le aree prese in esame per la stadiazione sono: linfonodi cervicali, ascellari, inguinofemorali, testa e collo, milza o fegato. I tre stadi presentano le seguenti caratteristiche:

STADIO A: Hb ≥ 100g/L (10g/dL) e piastrine in numero ≥ 100 x 10⁹/L e fino a due delle aree coinvolte descritte in precedenza.

STADIO B: Hb ≥ 100g/L (10g/dL) e piastrine in numero ≥ 100 x 10⁹/L e organomegalia maggiore rispetto a quella definita nello stadio A (3 o più aree di linfonodi coinvolte o organi ingrossati).

STADIO C: pazienti con anemia, Hb < 100g/L (10g/dL) e/o conta piastrinica < di 100 x 10⁹/L, come segno di insufficienza midollare indipendentemente dall'organomegalia. Rappresenta lo stadio più aggressivo.

La classificazione Rai è prevalentemente applicato negli Stati Uniti, il secondo modello è maggiormente utilizzato in Europa. L'inizio del trattamento, secondo le attuali raccomandazioni NCI-IWCLL, si basa su

questi due modelli, difatti la presenza di anemia e/o piastrinopenia (stadi Rai III-IV e Binet C) rappresenta un'indicazione al trattamento (Hallek et al, *Blood* 2008).

Tuttavia, questi due modelli, presentano una serie di limitazioni, soprattutto perché sono stati sviluppati nell'era in cui la patogenesi della LLC era completamente ignota (Delgado et al., *Am J Hematol.* 2017) Pertanto, accanto ai criteri di stadiazione clinica e di alcuni parametri di laboratorio (come ad esempio il tempo di duplicazione dei linfociti), sono stati proposti marker biologici, di seguito descritti, che riflettono le proprietà biologiche di ogni singolo caso di LLC. E' importante sottolineare che, il loro potere predittivo dipende dal momento in cui viene valutato nel corso della malattia. Questo spiega il motivo per cui alcuni marcatori vengono studiati solo alla diagnosi mentre altri anche in momenti diversi della malattia (ad es. durante progressione) (Chiorazzi N. et al., *Hematology Am Soc Hematol Educ.* 2012)

1.7.2 Marcatori sierici della massa tumorale

Tra i parametri sierici, la timidina chinasi (TK), la β 2-microglobulina (β 2-MG) e il CD23 solubile, mostrano una notevole rilevanza prognostica (Hallek et al., *Blood* 2008). Essi rappresentano i primi marker biologici ad essere stati individuati, pertanto sono anche noti come fattori prognostici biologici "classici". Tuttavia, essendo prevalentemente correlati all'espansione del clone leucemico sono indicativi solo quando la malattia è in fase di peggioramento e quindi non sono in grado né di definire la risposta alla terapia né di predire il rischio di progressione che ogni singolo paziente presenta al momento della diagnosi, pertanto loro utilità è piuttosto limitata.

Negli ultimi anni le progressive acquisizioni in merito alla patogenesi della malattia hanno consentito di definire nuovi marcatori prognostici utilizzabili fin dal momento della diagnosi ed in grado di definire in modo accurato il decorso clinico della malattia. Questi fattori sono rappresentativi di alcune delle caratteristiche biologiche del clone leucemico cruciali nel delineare la sua capacità di proliferazione e di invasione dei vari tessuti. Lo studio di questi marcatori si avvale di tecniche di immunocitofluorimetria, citogenetica e biologia molecolare.

1.7.3 Marker proteici

I principali marker proteici sono:

- **ZAP-70:** è una tirosin chinasi intracellulare che in condizioni fisiologiche si ritrova unicamente nelle cellule T e NK, ed è coinvolta nella via di trasduzione del segnale del recettore delle cellule T (TCR) innescata dal legame con l'antigene. E' quindi responsabile dell'attivazione cellulare antigeni-dipendente. Inoltre, sia le

cellule B normali nei primi stadi di differenziamento (cellule pro B e pre B) che le cellule maligne possono esprimere ZAP-70. L'espressione della proteina aberrante aumenta l'attivazione della via di segnale mediata dal BCR, poiché sembrerebbe ritardare l'internalizzazione di alcune componenti di membrana del recettore (sIgM e CD79b) prolungandone quindi l'attivazione. In più ZAP-70 gioca un ruolo fondamentale nel microambiente tumorale poiché non solo può promuovere la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, regolando le interazioni tra chemochine e BCR, ma può anche inibire l'apoptosi favorendo l'espressione di molecole di adesione come CD49d (Chiarozzi et al. *Hematology Am Soc Hematol Educ.* 2012). E' ormai stabilito che la presenza di più del 20% di cellule positive a ZAP-70 è correlata ad un inferiore tasso di sopravvivenza (Boddu et al., *Curr Hematol Malig Rep.* 2018), per cui la positività per ZAP-70 è determinata da un valore cut off > 20% (Strati et al., *Mayo Clin Proc.* 2018).

- **CD38:** è una glicoproteina transmembrana espressa nelle cellule emopoietiche, soprattutto nelle cellule B e T attivate, come anche nelle cellule natural killer (NK) e dendritiche. In particolare, nelle cellule B l'espressione di CD38 varia fisiologicamente in base alla fase di maturazione della cellula, del suo stato di attivazione e del contesto in cui la cellula viene stimolata. E' coinvolta nel processo apoptotico delle cellule B normali, promuovendo la sopravvivenza e la proliferazione (Malvasi et al, *Physiol Rev* 2008). E' ormai noto che nel clone LLC la percentuale di cellule esprimenti il CD38 è un indice del grado di attivazione cellulare del clone stesso. Difatti, l'alta espressione di CD38 è associata ad uno stadio avanzato e predice un tempo al primo trattamento più breve ed inferiore PFS (Progression Free Survival) e OS (Overall Survival) (Boddu et al., *Curr Hematol Malig Rep.* 2018).

Ad oggi manca ancora un valore soglia univoco per stabilire la positività al CD38, tuttavia appare che l'espressione maggiore del 20% nelle cellule è associata ad un significativo più breve tempo di PFS ed ad un' inferiore risposta alla chemo-immunoterapia a base di fludarabina e a caratteristiche sfavorevoli sia cliniche (forme a morfologia atipica, infiltrazione midollare di tipo diffuso, elevata linfocitosi) sia citogenetiche (più frequentemente 11q e 17p) (Boddu et al., *Curr Hematol Malig Rep.* 2018).

- **CD49d:** è una subunità dell'integrina $\alpha 4\beta 1$ ed è coinvolto nell'ancoraggio delle cellule ai tessuti attraverso la matrice extracellulare, funzione che può condizionare la sopravvivenza e migrazione delle cellule di LLC. L'alta espressione di questa proteina sembra essere correlata ad un minore TTFT (Time to First Treatment) (Rossi et al, *Haematologica* 2008). Sembra essere un marker con valore prognostico indipendente da *IGHV* e dalla FISH e tra tutti gli indicatori valutati mediante citofluorimetria a flusso, sembra essere il più forte predittore del tempo al primo trattamento (TTFT) e dell'OS (Bulian et al, *J Clin Oncol* 2014). Inoltre, uno studio multicentrico recente ha dimostrato una concordanza tra l'espressione di CD49d e CXCR4 (recettore per chemochine), ovvero di due molecole coinvolte nella regolazione della migrazione leucocitaria. Infatti, le cellule LLC con elevati livelli di CXCR4 aderiscono meglio agli elementi stromali del microambiente e quindi sarebbero meglio protette dall'azione di farmaci citotossici nella nicchia tumorale, costituendo quindi una fonte di cellule per la malattia minima residua (MRD) (Majid A.,

et al., *Leuk Res* 2011). Ad oggi, il CD49d è fonte di molto interesse per il suo potenziale uso come bersaglio terapeutico.

1.7.4 Fattori citogenetici e molecolari

➤ Anomalie citogenetiche ricorrenti

Dagli anni '70 sono stati eseguiti numerosi studi che mediante l'utilizzo di diversi approcci metodologici (tecniche di bandeggio, FISH, analisi dei microsatelliti per individuare la LOH, il sequenziamento Sanger, CGH e SNP arrays e più recentemente tecniche di NGS), hanno rilevato che la LLC è caratterizzata da un genoma relativamente stabile rispetto alle altre neoplasie ematologiche e ai tumori solidi (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Alla diagnosi, l'80% dei casi mostra tra 0 e 2 *copy number alterations* (CNA), mentre il restante 20% presenta ≥ 3 anomalie (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014) (Malek S.N., *Oncogene* 2013).

Nel 2000 Dohner et al confermarono, per la prima volta, con la metodica di FISH, la frequente localizzazione di anomalie citogenetiche a livello dei cromosomi 11, 12, 13 e 17 (80% dei casi alla diagnosi), definendo il ruolo prognostico per ciascuna di queste quattro lesioni genetiche. Tali autori, hanno costruito un modello di rischio gerarchico, in base all'evidenza che i pazienti con del(17p13) avevano una sopravvivenza minore (32 mesi), seguiti da pazienti con del 11(q23) (79 mesi), trisomia del 12 (111 mesi), cariotipo normale (114 mesi) e del(13q14) come sola alterazione (133 mesi) (Fig. 4) (Dohner et al, *N Engl J Med* 2000).

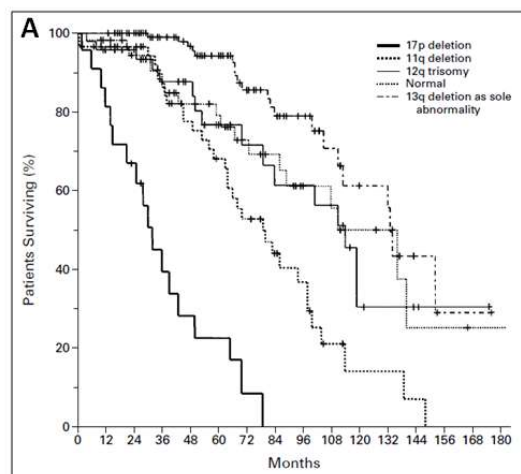


Figura 4 Curve di sopravvivenza delle anomalie citogenetiche ricorrenti in pazienti con LLC. I pazienti con del(17p) mostravano una OS media di 32 mesi, seguiti dai pazienti con del(11q) (OS 79 mesi), con trisomia 12 (OS 114 mesi), con cariotipo normale (OS 111 mesi) e con del(13q) (OS 133 mesi) (Döhner H et al. *N Engl J Med* 2000).

Già dai primi studi successivi alla classificazione prognostica di Dohner et al., emergeva che le alterazioni cromosomiche erano fattori indipendenti dallo stato mutazionale dei geni *IgHV*, sebbene le anomalie a prognosi sfavorevole [del(11q) e del(17p)] erano più frequenti nei casi con *IgHV* non mutato. Pertanto l'analisi mediante FISH delle anomalie citogenetiche ricorrenti ha rappresentato e rappresenta ancor'oggi uno strumento ampiamente utilizzato nella pratica clinica per la stratificazione prognostica dei pazienti con LLC (Krober A et al., *Blood* 2002).

- **del(13q14):** La delezione di 13q14 è l'aberrazione cromosomica più comune nella LLC, con una prevalenza del 40-60% dei casi alla diagnosi. Essa si differenzia dalle altre aberrazioni cromosomiche in quanto può essere individuata in eterozigosi (delezione monoallelica nel 76% dei casi) o omozigosi (delezione biallelica nel 24% dei casi). La delezione biallelica sembra essere associata ad una fase tardiva della storia naturale della LLC, in quanto sembra essere maggiormente correlata ad una malattia più aggressiva (Stilgenbauer S. et al *Haematologica* 2007) (Foà et al., *Haematologica* 2013). Sebbene, i dati FISH di diversi lavori concordano con il significato prognostico favorevole della del(13q14) quando compare come unica aberrazione (spesso associata a *IGVH* mutato), è importante sottolineare che in questo gruppo di pazienti si osserva una certa eterogeneità clinica. Difatti secondo alcuni autori, la dimensione della delezione, in base ai geni coinvolti, e la taglia del clone (ossia la percentuale di nuclei interfascici con delezioni in 13q) potrebbero influenzare la prognosi (Rodríguez-Vicente A.E., et al., *Cancer Genetics* 2013) (Dal Bo M, et al., *Genes Chromosomes Cancer*. 2011). E' possibile suddividere i pazienti in due gruppi in base alla percentuale, maggiore o minore del 80%, di cellule con del(13q) (Chena C et al, *Eur J Haematol*.2008) (Orlandi et al., *Hematological* 2013): i pazienti con una percentuale > 80% sembrano mostrare un più breve OS e TTFT rispetto ai pazienti con percentuale <80% di cellule con del(13q) (Van Dyke. D.L. *British Journal of Haematology* 2016). Inoltre, studi eseguiti mediante microarrays hanno dimostrato che i punti di rottura sono eterogenei, infatti la dimensione della regione deleta può variare sostanzialmente in dimensioni, da un minimo di ~300 kbp fino a > 70 Mb. Tali studi hanno portato a definire la regione minima deleta ("minimal deleted region", MDR), distale rispetto al locus dell'oncosoppressore Retinoblastoma-1 (*RB-1*), contenente il gene *DLEU2* ed i microRNA (miR) 15a/16-1. Sono stati proposti due tipi principali di delezioni (Grygalewicz et al., *Mol Cytogenet*. 2016):

tipo I, delezione corta che rappresenta la MDR, con punto di rottura localizzato nei locus *miR15/miR16* senza coinvolgimento di *RBI*. In questa regione, oltre al cluster dei due micro RNA è anche contenuto il locus *DLEU2* (lymphocytic leukemia 2), che codifica per un lungo RNA non codificante (lncRNA) *DLEU2*, il gene *DLEU1* che codifica per un lungo RNA non codificante (lncRNA) *DLEU1* ed il gene *DLEU7* che codifica per un regolatore negativo del fattore nucleare κ -B (NF- κ -B) (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

tipo II, (20% dei casi) delezione che coinvolge una regione più ampia ed include il locus *RBI* e quindi con una maggiore complessità genomica (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016) (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014).

Generalmente le delezioni biallelica è di tipi I mentre le delezioni più grandi sono monoalleliche (Grygalewicz et al., *Mol Cytogenet*. 2016). E' stata dimostrata un'interessante associazione fra la dimensione della del(13q) e l'andamento clinico: pazienti con lesioni di dimensioni maggiori, comprendenti il gene *RBI*, presentano un breve TTFT ed un'inferiore OS (Parker et al, *Leukemia* 2011) (Dal Bo et al, *Genes Chromosomes Cancer* 2011). Diversi studi hanno tentato di definire il ruolo patogenetico della del(13q) nella LLC, prevalentemente attribuito esclusivamente ai miR15a e miR16-1, in quanto risultano deleti nella maggior parte dei casi. Sono difatti considerati i geni chiave del meccanismo patogenetico della delezione in 13q14 (Grygalewicz et al., *Mol Cytogenet*. 2016).

- **Trisomia 12:** La trisomia 12 (+12) è tra le aberrazioni più frequenti nella LLC, si verifica nel 10-20% dei casi alla diagnosi, spesso è presente come sola alterazione citogenetica (40-60% con +12) (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). La sua incidenza non aumenta alla recidiva o nei pazienti refrattari (Gunnarsson et al, *Haematologica*, 2011). E' spesso associata ad altre alterazioni cromosomiche come, la trisomia 18,19, a delezioni ricorrenti (es. del14q, 13q, 11q e 17p) e a traslocazioni 14q32. Dal punto di vista clinico, la LLC con trisomia 12 si caratterizza per morfologia ed immunofenotipo atipico (Rodríguez-Vicente A.E., et al., *Cancer Genetics* 2013). E' considerata un'alterazione *driver* che avviene precocemente, facilitando la comparsa di alterazione citogenetiche e molecolari secondarie, prevalentemente a livello di *NOTCH1*, *TP53* e *FBXW7* (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Dal punto di vista prognostico, inizialmente era definita come un'anomalia cromosomica a rischio intermedio (Dohner et al, *N Engl J Med* 2000); recentemente invece, da studi prospettici è emerso che, sebbene la sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) possa essere più breve, l'OS è favorevole. Un' ulteriore prova del significato prognostico favorevole di tale anomalia è data dalla sua rara associazione a mutazioni *TP53* (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014) e a *IgHV* mutato. Tuttavia, più recentemente, è stato anche dimostrata una forte associazione tra +12 e mutazioni in *NOTCH1*, soprattutto nei casi con marker di prognosi sfavorevole (come l'espressione di CD38 e CD49d). Ciò potrebbe spiegare l'outcome sfavorevole in un piccolo sottogruppo di LLC con +12 (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Il meccanismo mediante il quale la trisomia 12 contribuisce alla patogenesi della LLC è ancora sconosciuto. Risulta difficile definire un gruppo di geni coinvolti nella patogenesi della LLC, dato che l'anomalia citogenetica comprende l'intero cromosoma. La trisomia 12 è associata ad un *up-regolazione* di geni che si trovano lungo l'intero cromosoma 12, tra cui *P27*, *CDK4*, *HIP1R*, *MYF6* e *MDM2*. In particolare il gene *MDM2* ("murine double-minute 2 gene") è coinvolto nella degradazione di *TP53* e la sua over-espressione comporta una inattivazione funzionale del

prodotto di *TP53* (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Infine, i pazienti con trisomia 12 hanno una più alta incidenza di tumori secondati (es. Sindrome di Richter), in linea con l'alta frequenza di +12 in pazienti con Sindrome di Richter (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

- **del(11q22-q23):** La delezione del braccio lungo del cromosoma 11 è rilevata alla diagnosi nel 5-20% dei pazienti con LLC. La dimensione di tale delezione è altamente variabile, sebbene nella maggior parte dei casi è più grande di 20 Mb e risulta generalmente una delezione monoallelica (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). La regione cromosomica tipicamente deleta è rappresentata dalla banda 11q22.3-q23.1 che contiene all'interno il gene *ATM*. I pazienti con del(11q) mostrano un aumento dei CNV, sottolineando l'alta instabilità genomica provocata da questa anomalia. E' spesso associata a *IgHV* non mutato (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Poiché la delezione coinvolge quasi sempre il gene *ATM* questo è stato ampiamente studiato ma la mutazione di tale gene è emersa solo nell'8-30% dei casi dimostrando che altri geni potrebbero giocare un ruolo rilevante nella patogenesi delle LLC. Tra i vari geni, il principale candidato è rappresentato da *BIRC3*, localizzato vicino ad *ATM*. Ad oggi, il ruolo di altri geni presenti nella regione 11q22-q23.1 rimane irrisolto (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013). Dal punto di vista clinico, pazienti con del(11q) presentano tipicamente numerose linfadenomegalie, sintomi sistemici di tipo B, giovane età (età mediana di 59 anni), una malattia a rapida progressione e ridotta OS (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).
- **del(17p13):** la delezione del 17p13 è stata ritrovata nel 3-8% dei pazienti alla diagnosi, incidenza che aumenta in pazienti trattati con chemioterapia e nelle LLC refrattarie. Pertanto questa è una delle più comuni alterazione citogenetiche acquisite dopo trattamento, non solo nella LLC ma anche in altri linfomi non-Hodgkin's (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). La delezione comprende sempre il locus di *TP53*, ma di solito copre la maggior parte del braccio corto del cromosoma 17, coinvolgendo anche altri geni. Inoltre, in molti casi (75%) si osserva contemporaneamente la perdita di un allele e la mutazione nel rimanente. Spesso mutazioni a carico di *TP53* si ritrovano anche in pazienti privi della delezione, anche se questa evenienza è meno frequente alla diagnosi (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013). Tale lesione citogenetica è di solito associata con un decorso clinico molto aggressivo, breve OS ed ad una mancata risposta alla terapia. Nonostante ciò, recenti studi hanno mostrato che l'eterogeneità clinica dei pazienti con del(17p) dipende dal momento in cui essa appare: alla diagnosi, quindi come evento primario (*de novo*), o durante il *follow-up*, come accade più frequentemente, e quindi come anomalia secondaria. Pazienti con del(17p) *de novo* mostrano una più lunga OS (4-5 anni) mentre quelli con delezione acquisita durante l'evoluzione clonale mostrano una notevole diminuzione della sopravvivenza (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Inoltre, la presenza di cellule con perdita di *TP53* > 20% è stata associata ad una prognosi sfavorevole, mentre i pazienti con <20% di cellule con perdita di

TP53 mostrano una prognosi sovrapponibile alla serie globale (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013).

I pazienti con del(17p), sono associati ad immunofenotipo atipico, con una più alta intensità di espressione di CD20, FMC7, CD79b e di Ig di superficie; in accordo con la prognosi infausta, i pazienti con del(17p) sono spesso associati a positività per ZAP70, CD38, e *IgHV* non mutato. Altri studi hanno dimostrato una notevole correlazione tra, del(17p) ed alcune anomalie citogenetiche tra cui delezioni in 4p, 18p, 20p ed anomalie del cromosoma 8 [del(8p) e add(8q)].

Le mutazioni/delezioni di *TP53* aumentano in fase di progressione di malattia e si accumulano nei pazienti chemio-refrattari, rappresentando il 40% dei casi resistenti alla terapia (Zenz et al, *Blood* 2009). Difatti i pazienti con del(17p) e/o mutazioni in *TP53* non rispondono al trattamento standard a base di Fludarabina e Ciclofosfamide o Fludarabina-Ciclofosfamide-Rituximab. Per tale ragione, diverse studi si sono focalizzati nel trovare il trattamento farmacologico più opportuno per tali pazienti. Tra i diversi “*new targeted drugs*” proposti, l’Ibrutinib sembra essere associato ad una buona risposta. Comunque, ad oggi, i pazienti con del(17p), una volta raggiunta la remissione completa dovrebbero essere candidati al trapianto di cellule staminali (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014).

➤ **Altre anomalie citogenetiche**

Sono state descritte numerose altre aberrazioni cromosomiche ricorrenti nella LLC, come ad esempio trisomia totale o parziale del cromosoma 3, trisomia 19, trisomia 8 e trisomia 18 ma, essendo molto rare, il loro significato prognostico non è noto (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013). Contrariamente, è noto il significato prognostico della del(6q), osservata solo nel 6% dei pazienti affetti da LLC. È generalmente considerata un’anomalia a rischio intermedio, in quanto è associata a linfocitosi più prominente con morfologia atipica, splenomegalia, tassi più elevati di positività a CD38, e nessuna associazione con lo stato mutazionale *IGHV* (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013).

➤ **Traslocazioni**

A differenza delle altre neoplasie ematologiche, la LLC non è caratterizzata dalla presenza di traslocazioni cromosomiche specifiche. Le traslocazioni sono maggiormente rinvenute nel contesto di cariotipi complessi e sembrano essere associate ad un decorso clinico infausto, sia in termini di TTFT che OS, anche per i pazienti con la sola del(13q), marker di prognosi favorevole (Mayr C. et al., *Blood* 2006).

I geni delle immunoglobuline (14q32) sono i geni maggiormente coinvolti nelle traslocazioni (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013). Essi presentano come *partner* cromosomici ricorrenti quei geni che sono normalmente coinvolti nelle traslocazioni degli altri disordini linfoproliferativi. Tra questi i più frequenti sono 18q21/*BCL2*, 19q13/*BCL3* ed altri *partners* identificati occasionalmente sono 2p12/*BCL11A*, 2p13, 4p16, 4p31, 5q31, 6p21/*CCND3*, 7q21/*CDK6*, 8q11, 9q34 e 17p1 (Martín-Subero J.,

Leukemia 2007) (Put N. et al., *Leukemia* 2009). La traslocazione t(14;18)(q32;q21), sebbene sia caratteristica del linfoma follicolare è stata descritta ampiamente anche nella LLC, seppure appare molecolarmente diversa. (Nowakowski G.S. et al., *Br J Haematol*, 2006). Questa traslocazione porta alla over-espressione della proteina anti-apoptotica bcl-2, ma il suo ruolo patogenetico rimane ipotetico e poco chiaro (N Put N. et al., *Leukemia* 2009). Un recente lavoro ha dimostrato che i pazienti con la t(14;18)(q32;q21) hanno un outcome migliore rispetto a quelli che presentando altri *partner* di traslocazioni con il cromosoma 14 (Davis M.S. et al., *Br. J. Haematol.*, 2015).

La t(14;19) è associata ad una forma aggressiva di LLC e ad anomalie cromosomiche aggiuntive, specialmente trisomia 12, ad *IGHV* non mutato ed è frequentemente presente nei casi di LLC con morfologia atipica (Michaux et al, *Cancer Genet Cytogenet* 1997).

Traslocazioni coinvolgenti *MYC*, sia che presentano come *partner* il gene *IgHV*, sia che non sono ad esso associato, sono stati osservanti nell'1% dei casi ma identificano comunque un sottogruppo di pazienti a prognosi infausta rispetto alla popolazione di pazienti con LLC generale. E' stato ipotizzato che tali traslocazioni potrebbero essere un evento secondario e quindi svolgere un ruolo nella trasformazione della LLC. Sono stati descritti anche casi di LLC con traslocazioni coinvolgenti il cromosoma 13q, infatti il 10% delle delezioni individuate tramite FISH corrispondono in realtà a traslocazioni rivelate mediante citogenetica convenzionale. Diversi possono essere i *partners* ma la conseguenza di tale riarrangiamento consiste quasi sempre nella perdita dei geni oncosoppressori nel *locus* 13q14. L'impatto sulla prognosi non è chiaro, alcuni autori ritengono che i pazienti con tale traslocazione hanno un decorso clinico più aggressivo.

Infine, alcuni autori suggeriscono che la prognosi della del(17p), potrebbe essere modificata se tale anomalia derivi da traslocazioni in 17p. Tale anomalia sembrerebbe essere associata ad uno stadio precoce e ad una progressione accelerata della malattia (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014).

➤ CARIOTIPO COMPLESSO (CK)

Il cariotipo complesso, definito come la presenza di 3 o più anomalie è stato individuato nel 20% dei casi con LLC. I pazienti con CK sono associati a fattori di prognosi infausta, ovvero del(17p), del(11q), *IgHV* non mutato ed ad una maggiore espressione di CD38. Dati recenti hanno dimostrato che la complessità genomica, valutata tramite cariotipo convenzionale con la stimolazione di cellule in coltura con DSP30/IL2, può essere utile nella valutazione della prognosi di pazienti con un pannello FISH normale (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013). Un recente lavoro di Rigolin e collaboratori, eseguito su una coorte di 200 pazienti, ha dimostrato che il cariotipo complesso risulta un forte predittore di *outcome* sfavorevole (Rigolin et al., *Joun. of Hem. & Onc.*, 2016). Inoltre, secondo tale studio, poiché il cariotipo complesso riflette l'alto livello di instabilità genomica sembrerebbe predire meglio la peggiore OS rispetto all'analisi mutazionale dei geni frequentemente mutati nella LLC, con unica eccezione per le mutazioni in *TP53* (Rigolin, et al *J. Hemat. & Onc.*, 2016). Questo dimostra il ruolo cruciale della citogenetica classica, in

quanto nei casi con FISH normale sarebbe opportuno studiare anche le metafasi con i nuovi agenti stimolanti (Rodríguez-Vicente A.E., *Cancer Genetics*, 2013). Anche la tecnica degli CGH arrays potrebbe essere utile nel definire il cariotipo complesso, fornendo una visione *genome wide* a più alta risoluzione rispetto alla citogenetica convenzionale (Puiggros et al., *Bioed Res Int* 2014)

Inoltre, un recente lavoro di Thompson et al., ha rilevato che la complessità del cariotipo è un forte predittore di outcome sfavorevole anche in pazienti con LLC refrattaria o recidivante trattati con Ibrutinib (Thompson P.A. et al., *Cancer* 2015).

Infine, il cariotipo complesso è anche legato al concetto di evoluzione clonale. Infatti, l'acquisizione di nuove anomalie cromosomiche da parte del clone neoplastico comporta lo sviluppo di subcloni con diversi profili citogenetici che se acquisiscono un vantaggio di sopravvivenza, sono responsabili di una maggiore aggressività della malattia con conseguente riduzione della OS e minor risposta ai convenzionali trattamenti chemioterapici (Dewald GW et al. *Br J Haematol.* 2003).

1.7.5 FATTORI PROGNOSTICI MOLECOLARI

➤ Lo stato mutazionale *IGHV*

Nel 1999, due importanti lavori dimostravano per la prima volta l'impatto prognostico dello stato mutazionale dei geni *IGHV* nella LLC, evidenziando come l'analisi dello status mutazionale fosse in grado di stratificare i pazienti in due distinti gruppi sul piano prognostico: uno a buona prognosi (*IgVH* mutato, M-LLC) ed uno a cattiva prognosi (*IgVH* non mutato, UM-LLC) (Damle et al, *Blood* 1999) (Hamblin et al, *Blood* 1999). In entrambi gli studi, i pazienti con geni *IGHV* non mutati mostravano, rispetto al gruppo M-LLC, una malattia più aggressiva, alterazioni citogenetiche sfavorevoli, una cattiva prognosi con una sopravvivenza media di soli 8 anni. Ad oggi è dimostrato il ruolo indipendente dello stato mutazionale *IgHV* dai fattori prognostici tradizionali, in particolar modo dallo stadio clinico. Inoltre appare un potente marker prognostico non solo perché rimane costante durante tutto il decorso della malattia (Langerak *et al*, *Leukemia* 2011) ma anche perché è in grado di fornire informazioni predittive sul PFS e sulla sopravvivenza anche nei pazienti ai primi stadi della malattia (Vasconcelos Y. et al., *Blood* 2003). Inoltre, Come già descritto nel paragrafo “*patogenesi della LLC*”, i due sottogruppi clinici, ovvero M-LLC e UM-LLC, mostrano non solo una notevole differenza prognostica ma anche clinico biologica, tale che questi due *subset* sembrano appartenere a due entità patologiche distinte con origine diversa. I pazienti UM-CLL sono spesso caratterizzati da necessità di trattamento specifico con scarsa risposta alla chemioterapia, precoce recidiva di malattia, elevata probabilità di evoluzione in sindrome di Richter e con anomalie citogenetiche ed immunofenotipiche sfavorevoli (rispettivamente, del(11q), del(17p) e del ZAP-70⁺) (Rodríguez-Vicente A.E. et al., *Cancer Genet.* 2013). E' stato anche osservato che, pazienti con *IgHV* non

mutato hanno una maggiore probabilità di subire l'evoluzione clonale, con una maggiore tendenza ad acquisire anomalie citogenetiche a prognosi infausta (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

La valutazione dello stato mutazionale dei geni *IgHV* viene eseguita mediante tecniche di sequenziamento; la sequenza del DNA d'interesse, estratta da linfociti B, viene confrontata con la sequenza germinale. Se tale sequenza varia di oltre il 2% dalla sequenza germinale si parla di *IgHV* mutato (M-LLC). Viene preso in considerazione tale *cut-off* perché un piccolo numero di mutazioni potrebbero rappresentare polimorfismi; contrariamente, se l'omologia tra le sequenze è $\geq 98\%$ si parla di *IgHV* non mutato (UM-LLC) (Hallek M., et al., *Blood* 2008).

Nonostante il suo robusto valore prognostico, l'analisi dello status mutazionale *IgHV*, è fortemente svantaggiata dall'impiego di metodiche costose (sequenziamento) non sempre disponibili nella routine clinica (Parikh S.A., *Seminars in Oncology* 2016). Per tentare di superare tale limite, diversi studi si sono concentrati nell'individuazione di nuovi marcatori surrogati per la corretta definizione della prognosi. Inizialmente, sembrava essere dimostrata una notevole concordanza tra lo status mutazionale *IgVH* e l'espressione del marker CD38. Successivamente tale evidenza è stata confutata da ricerche che hanno evidenziato il ruolo indipendente dei due fattori prognostici, soprattutto a causa della variabilità d'espressione del CD38 nel corso della malattia (Montillo M, et al., *Haematologica* 2005).

E' stata, invece, dimostrata la concordanza completa tra lo status mutazionale *IgHV* e l'espressione del marcatore ZAP-70, entrambi marker costanti nel tempo. Infatti, la maggior parte dei casi M-LLC sono ZAP-70 negativi, mentre quelli UM-LLC sono ZAP-70 positivi (Crespo M, et al., *N Engl J Med*.2003) (Wiestner A., *Blood* 2003).

➤ **Mutazioni di *TP53*:**

Il gene *TP53*, anche conosciuto come “guardiano del genoma”, è un oncosoppressore localizzato a livello delle braccia corte del cromosoma 17 (17p13.1), codifica per una proteina con un ruolo cruciale nel controllo del *pathway* di regolazione della risposta cellulare al danno del DNA. Le mutazioni di *TP53* sono state descritte nel 4-12% dei pazienti non trattati affetti da LLC, e nella maggior parte dei casi (~ 70%) con del(17p) (Shahjahani M. *Cell. Oncol.*,2015) (Parikh S.A., *Seminars in Oncology* 2016). Circa 80-90% dei casi con una delezione di una copia del locus di *TP53* mostra mutazione dell'allele rimanente; solo nel 10% la mutazione *TP53* è rilevata in assenza di del(17p) (Foà et al., *Haematologica*.2013). Tale dato non è da sottovalutare dato che i pazienti con mutazioni di *TP53* mostrano OS breve comparabile ai pazienti con la del(17). Pertanto il risultato di FISH negativo potrebbe far includere i pazienti in una classe prognostica erronea (Rossi et al., *Clin Cancer Res.*;2009).

Lo studio molecolare delle mutazioni della *TP53* nella LLC mostra che nella maggior parte dei casi le mutazioni sono di tipo missenso e si verificano (75% dei casi) soprattutto a livello degli esoni 5-9, codificanti il dominio di legame al DNA; poche mutazioni avvengono nell'esone 4 e raramente si verificano a livello dell'esone 10. Nel restante 25% si tratta o di mutazione *frameshift*, o di sostituzioni "non-senso" o di mutazioni nei siti di "splice". In tutti e tre i casi l'effetto finale è lo stesso: viene trascritta una proteina sottoposta ad un severo evento "troncante" (Malek S.N., *Oncogene* 2013).

La frequenza di mutazioni della *TP53* varia durante le diverse fasi della storia naturale della malattia. Infatti, sebbene sia un'anomalia piuttosto rara alla diagnosi (5-10% dei casi), essa tende ad aumentare alla prima progressione di malattia (10% di tutti i casi), incidenza che aumenta al 40% nei casi di LLC recidivati/refrattari alla fludarabina (Foà et al., *Haematologica* 2013). La refrattarietà a tale agente chemioterapico dipende proprio dal suo meccanismo d'azione in quanto agisce sfruttando l'attività pro-apoptotica ed anti-proliferativa della *TP53*, inducendo danno al DNA. Meccanismo condiviso anche da altri classi di chemioterapici, quali gli analoghi delle purine e gli agenti alchilanti, che spesso sono utilizzati nel trattamento di prima linea della LLC. Difatti, si osserva una buona risposta, in seguito a terapie che sfruttano meccanismo terapeutici *TP53*-indipendenti. Studi longitudinali hanno, inoltre, dimostrato l'espansione di cloni *TP53*-mutati dopo chemio-immuno terapia (Nadeu F. et al., *Blood* 2016). Da analisi eseguiti mediante, tecniche di NGS *ultra-deep*, è emerso che la mutazione *TP53* sottoclonale influisce negativamente sull'OS analogamente a quanto accade in caso di mutazione clonale, anche in assenza di delezione dell'altro allele (Nadeu et al., *Blood* 2016). Inoltre, studi longitudinali hanno dimostrato che l'acquisizione di nuove mutazioni a carico di *TP53* può essere la causa di mancata risposta al trattamento o ad evoluzione in sindrome di Richter (Foà et al, *Haematologica* 2013). Ciò spiega perché le recenti linee guida raccomandano di testare ripetutamente le lesioni di *TP53*, non solo al momento del trattamento ma anche nei casi che sono precedentemente risultati *wild-type* (Rai KR et al. *Am. J. Hematol.*, 2016).

➤ **Mutazioni di *ATM***

Il gene *ATM* è un membro della famiglia di geni fosfatidil inositolo-3-chinasi (*PI3K*) e codifica per una chinasi serina / treonina nucleare. L'espressione di *ATM* aumenta in seguito a danno del DNA, causando l'arresto nelle fasi di *checkpoint* G₁/S e G₂/M del ciclo cellulare e l'attivazione di percorsi di riparazione del DNA e la conseguente apoptosi in caso di mancata riparazione del danno. Se *ATM* non viene espresso, viene alterata il *pathway* di *TP53*, per cui la cellula va incontro ad un grave stress ossidativo, perdita di controllo del ciclo cellulare e mancata riparazione del DNA danneggiato, il che si traduce in progressione della malattia (Shahjehani M., et al., *Cell. Oncol.* 2015). Lo studio mutazionale di *ATM* è particolarmente arduo a causa delle sua notevole dimensione, rendendo difficoltoso distinguere mutazione con significato patologico già presente nella linea germinale da polimorfismi o da varianti non patologiche (Nadeau F. et al., *Blood* 2016). Inoltre, è stato osservato che mutazioni germinali di *ATM* descritte come patologiche sono spesso associate a del(11q), a differenza di quelle considerate non patologiche. Viene così confermata

l'ipotesi che varianti *germline* potrebbero influenzare l'evoluzione della malattia attraverso la perdita dell'altro allele (Nadeau F. et al., *Blood* 2016). La mutazione di *ATM* avviene nel 12-25% dei pazienti con LLC e come per *TP53*, *ATM* può essere inattivato da una mutazione somatica e/o da una delezione ma, diversamente da *TP53*, raramente le due lesioni sono co-presenti (Nadeau F. et al., *Blood* 2016). Solo 8-30% dei casi con del(11q) mostra anche mutazioni di *ATM* (Malek S.N., *Oncogene* 2013). Comunque, le alterazioni di *ATM*, sia causate da mutazione sia da delezione, rappresentano le lesioni genetiche più frequenti alla diagnosi (20% circa) ed al momento della richiesta di trattamento (35%) con significato prognostico negativo (Foà et al., *Haematologica* 2013). In particolare, l'inattivazione del secondo allele è associata ad un'ulteriore riduzione dell'OS rispetto ai casi con la sola del(11q). Interessante notare che, le mutazioni o delezioni del gene *ATM* bi-alleleliche dopo il trattamento primario con agenti alchilanti o trattamenti con analoghi delle purine sono state associate ad una prognosi peggiore ed ad una minore risposta al trattamento rispetto alla mutazione o delezione mono-allelelica (Shahjehani M., et al., *Cell. Oncol.* 2015).

➤ **Mutazioni di *NOTCH1***

NOTCH1 è una glicoproteina di membrana codificata dal gene *NOTCH1* localizzato a livello 9q34.3 ed è coinvolta nella regolazione dello sviluppo delle cellule emopoietiche. Nello specifico agisce come un fattore di trascrizione attivato dal ligando e regola l'attività di numerosi geni "target", come ad esempio *MYC*, *TP53* e la via di segnale di NF-κB (Amaya-Changa C.I. et al., *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016). Nel 80-90% dei casi avviene una delezione frameshift in due paia basi (c.7544_7545fsdel) nel esone 34, provocando la perdita del dominio PEST (sequenza peptidica ricca di proline (P), acido glutammico (E), serine (S), e treonina (T) a livello C-terminale, che rappresenta una regione importante per la degradazione proteosoma-mediata della forma intracellulare di *NOTCH1*), alterando la durata e l'intensità dell'attivazione del *pathway* da esso mediato. Dunque, a causa di difetti nella degradazione, l'isoforma mutata si accumula nella cellula provocando un'attivazione costitutiva del *pathway* di *NOTCH1*. La mutazione è presente alla diagnosi nel 4-10% dei pazienti ed aumenta (20%) nei pazienti refrattari al trattamento con fludarabina e nel circa 30% dei pazienti con sindrome di Richter (Amaya-Chana C.I. et al., *Best Pract Res Clin Haematol* 2016). Dal punto di vista prognostico i pazienti con mutazioni in *NOTCH1* hanno generalmente un TTFT, PFS e OS più breve e spesso si presentano con stadio Binet avanzato (Parikh S.A., *Seminars in Oncology* 2016). Ciò potrebbe essere spiegato anche dal fatto che tale anomalia è quasi sempre associata ad altri marcatori molecolari (*IGHV* non mutato, *TP53*, *XPO1* mutato) e citogenetici (trisomia 12, 50% dei casi) con rischio intermedio-elevato (Amaya-Chanaga C.L et al, *Best Pract Res Clin Haematol* 2016). Dal punto di vista clinico, secondo le attuali evidenze scientifiche le mutazioni di *NOTCH1* sono rilevanti quanto le mutazioni di *TP53*. In particolare, Oscier et al., hanno dimostrato che la mutazione di *NOTCH1* rappresenta il terzo più importante marker prognostico dopo la mutazione di *TP53* e lo status mutazionale di *IgHV* (Oscier et al., *Blood* 2013). Sono anche state descritte mutazioni in geni coinvolti nel *pathway* di *NOTCH1*. Un esempio è la mutazione nel gene *FBXW7* che codifica per una ligasi

che targhetta *NOTCH1* all'ubiquitizzazione. Tale mutazione determina un aumento del *signaling* di *NOTCH1*, con conseguenze non ancora del tutto chiare (Roos-Weil D. et al., *Am J Hematol* 2016). Una migliore comprensione dei meccanismi coinvolti nella segnalazione anti-apoptotica di *NOTCH1* nelle cellule di LLC può fornire indicazioni per la progettazione di future terapie mirate (De Falco F., et al., *Oncotarget*. 2015).

➤ **Mutazioni di *SF3B1***

SF3B1 è un gene localizzato a livello 2q33.1, codifica per una riboproteina (proteina SF31, subunità 1 del fattore 3 dello spliceosoma) che agisce con altre ribonucleoproteine per creare il macchinario dello spliceosoma responsabile dello *splicing* del RNA messaggero. Nella LLC queste mutazioni sono mutazioni puntiformi missenso, o meno frequentemente delezioni in frameshift, a livello di codoni ricorrenti (Lys666, Lys700, e Gly742). La presenza di mutazioni in *SF3B1* porta ad un anomalo *splicing* dell'RNA messaggero generando trascritti alterati che codificano per proteine coinvolte in meccanismi cancro-correlati, come controllo del ciclo cellulare, angiogenesi ed apoptosi (Amaya-Changa C.I. et al., *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016). Le mutazioni di *SF3B1* sono presenti in 5-10% di pazienti con LLC di nuova diagnosi, e nel 17% dei pazienti refrattari alla fludarabina. Rossi et al., hanno dimostrato che il 6% dei pazienti con Sindrome di Richter mostra mutazioni di *SF3B1* (Rossi et al., *Blood* 2013). Tale mutazione si trova associata preferibilmente a pazienti con del(13q14) e in essi si osserva un PFS e una OS più brevi, indipendentemente da altri marcatori prognostici (Parikh S.A., *Seminars in Oncology* 2016). Inoltre alcuni studi riportano anche una stretta associazione, ma senza raggiungere la significatività statistica, con la delezione 11q22-q23 e le mutazioni del gene *ATM* (Foà et al., *Haematologica* 2013). Lo studio del panorama molecolare della LLC ha dimostrato che la mutazione di *SF3B1* è, dopo *TP53*, la seconda più comune mutazione (Boddu P., et al., *Curr Hematol Malig Rep* 2018). Inoltre, secondo alcuni autori la mutazione di *SF3B1* è un fattore di prognosi indipendente, essendo individuata sia in pazienti con UM-LLC che M-LLC (Parikh S.A., *Seminars in Oncology* 2016). Analisi retrospettive hanno dimostrato che tale mutazione non ha un impatto sulla OS ma piuttosto è responsabile di un PFS ed un TTFT più breve rispetto ai pazienti affetti da LLC con *SF3B1* *wilde type* (Amaya-Chana C.I. et al., *Best Pract Res Clin Haematol* 2016). In più mutazioni di *SF3B1* sembrerebbero predire una risposta inferiore alla chemioimmunoterapia e una durata della remissione inferiore. E' interessante notare che *NOTCH1* e *SF3B1* sono mutazioni mutualmente esclusive e sono indipendentemente associate a prognosi avversa (Boddu P., et al., *Curr Hematol Malig Rep* 2018).

➤ **Mutazioni di *BIRC3***

La proteina *BIRC3* (baculoviral IAP repeat containing 3), codificata da un gene localizzato a livello del cromosoma 11q, strettamente vicino ad *ATM*, è parte di un complesso proteico che agisce come regolatore

negativo del *pathway* di NF- κ B. Regola negativamente la proteina MAP3K14 responsabile dell'attivazione della via di segnalazione NF- κ B. Pertanto mutazioni inattivanti *BIRC3* causano un'attivazione costitutiva della via MAP3K14 e comportano un aumento dei livelli di NF- κ B, conferendo alle cellule leucemiche una maggiore capacità proliferativa ed un meccanismo di resistenza all'apoptosi. La mancata espressione di *BIRC3*, nella LLC, può derivare da mutazioni o delezioni, ma anche dalla combinazione di entrambe. In uno studio di 166 pazienti con del(11q), la mutazione di *BIRC3* è stata osservata nel 83% dei casi e coesisteva con la delezione 11q (Boddu P., et al., *Curr Hematol Malig Rep* 2018). Nel complesso, sebbene le mutazioni di *BIRC3* sono rare nei pazienti affetti da LLC (~ 4%), risulta comunemente rinvenuta (~ 25% dei casi) in recidiva (Shahjehani M., et al., *Cell. Oncol.*2015). Il suo significato prognostico non è ancora stato completamente chiarito. Secondo alcuni autori, la distruzione di *BIRC3* è un fattore associato ad un inferiore OS, indipendentemente da altre caratteristiche ad alto rischio (Boddu P., et al., *Curr Hematol Malig Rep* 2018). Le mutazioni/delezioni di *BIRC3* sono spesso associate a *TP53 wild-type* (Parikh S.A., *Seminars in Oncology* 2016).

➤ **Mutazioni di *MyD88***

MyD88 mappa a livello di 3p21.3-3p22 e codifica per proteine citoplasmatiche che giocano un ruolo centrale nella risposta immune; essa funziona come una proteina traduttore del segnale nella via di segnalazione mediata dal recettore dell'interleuchina-1 e dal Toll like receptor (IL-1R / TLR) (Amaya-Changa C.I.et al., *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016). E' coinvolta nella risposta immunitaria primaria e nell'omeostasi delle cellule B e la sua attivazione provoca un aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie. Nel momento in cui i recettori TLR e IL-1R vengono attivati, *MyD88* viene fosforilata provocando l'attivazione della via di segnalazione mediata da NF- κ B. È stato dimostrato che, le mutazioni attivanti *MYD88*, aumentano l'attività di questo *pathway* e provocano resistenza all'apoptosi. La mutazione di *MyD88* avviene nel 5% dei pazienti ed è generalmente associata a prognosi favorevole, forse dovuta alla sua stretta associazione con marker di prognosi positiva, come *IgHV* mutato, del(13q) e bassa espressione di CD38 e di ZAP70 (Baliakas P. et al., *Am. J. Hematol.* 2015). Sembra che tale mutazione avvenga prevalente in pazienti giovani (<47 anni), indipendentemente dal stadio clinico (Amaya-Changa C.I.et al., *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016). I pazienti con mutazioni di *MyD88* presentano una quasi eguale OS rispetto alla popolazione generale e addirittura appare che i pazienti giovani affetti da LLC senza mutazioni *MyD88* (52% dei casi) abbiano una aspettativa di vita, calcolata a 20 anni dalla diagnosi, ridotta rispetto ai casi con mutazione del gene. Inoltre, i pazienti con *MyD88* mutato mostrano un tempo al successivo trattamento (misurato dal momento della risposta al primo trattamento) significativamente più lungo rispetto ai pazienti con *MyD88* non mutato (Amaya-Changa C.I.et al., *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016).

➤ **Mutazioni in altri geni**

In aggiunta ai geni sopra elencati, sono state descritte mutazioni anche in altri geni ma con una minore frequenza tra cui: *XPO1*, *FBXW7*, *POT1*, *LRP1B* ed *RBI* (Malek S.N., *Oncogene* 2013). Inoltre considerando il ruolo cruciale del *signaling* mediato da BCR nella patogenesi della LLC, sembra che mutazioni in geni coinvolti in questo *pathway* come, *EGR2* e *BRAF*, siano associati ad una cattiva prognosi (Ghamlouch H., *British Journal of Haematology* 2017).

Gli ampi studi genomici hanno quindi enfatizzato la complessa eterogeneità molecolare della LLC, facendo luce sui meccanismi patogenetici alla base di tale disordine linfoproliferativo e consentendo l'individuazione di nuove strategie terapeutiche (*target therapy*) strettamente correlate alla biologia della neoplasia (Boddu P., et al., *Curr Hematol Malig Rep* 2018).

1.7.6 Mutazioni epigenetiche

E' ormai noto che uno dei fattori responsabili dello sviluppo di neoplasie è rappresentato dalle modificazioni epigenetiche che possono contribuire alla de-regolazione dell'espressione genica. Tali meccanismi stanno acquisendo sempre più interesse perché, essendo fenomeni reversibili rappresentano un *target* terapeutico rilevante. Diversi composti, tra cui gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) sono stati testati *in vitro* sulle cellule di LLC. Fino ad oggi, però, la monoterapia mirata sulle deacetilasi istoniche, attraverso gli HDACi, ha mostrato un'attività modesta. (Rodríguez-Vicente A.E et al., *Oncotarget*. 2017).

E' stato rilevato che l'epigenoma della LLC è caratterizzato prevalentemente da regione geniche metilate, soprattutto a livello delle sequenze *enhancer* (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). Tuttavia, studi dei profili mutazionali hanno dimostrato una sostanziale eterogeneità di metilazione intratumorale, incrementando ulteriormente la complessità genetica della LLC. Inoltre, sembrerebbe che alti livelli di eterogeneità di metilazione intra-tumorale siano correlati con lesioni genetiche ad alto rischio, oltre che ad evoluzione clonale e ad una *outcome* sfavorevole (Fabbri et al. *Nat Rev Cancer*, 2016).

Recenti studi, hanno anche rilevato, una notevole differenza nel profilo di metilazioni tra i due *subsets* di LLC, ovvero UM-LLC e M-LLC. Poiché i pattern di metilazioni sono eventi ereditati possono essere utilizzati per rintracciare la cellula LLC di origine. Uno studio condotto da Kullis et al., ha dimostrato in tal modo, la presenza di un terzo *subset* di LLC in cui prevalgono cellule con *IgHV* mutato ma con un basso livello di ipermutazioni somatiche. Il precursore, probabilmente, è una cellula che ha interagito con l'antigene indipendentemente dai meccanismi di maturazione nei centri germinativi e quindi con poche mutazioni somatiche (Fabbri et al., *Nat Rev Cancer*. 2016).

Generalmente, la metilazione è responsabile del silenziamento di geni oncosoppressori. Nella LLC sono stati identificati molti nuovi geni epigeneticamente silenziati, come *TWIST-2*, che è un fattore di trascrizione ed un inattivatore della funzione di *TP53*; esso risulta metilato soprattutto in pazienti con *IgHV* mutato. Anche i livelli di espressione di *ZAP-70* correlano strettamente con la metilazione di specifiche isole CpG nel gene (Rodríguez-Vicente A.E et al., *Oncotarget*. 2017). Nel complesso, i punteggi di metilazione del DNA sono considerati come forti indicatori indipendenti predittivi di progressione della LLC.

In aggiunta, anche i miRNA, sono responsabili di regolazione epigenetica alterata nella LLC (Rodríguez-Vicente A.E et al., *Oncotarget*. 2017). I **MicroRNA** (miRNA o miR) sono molecole di RNA non codificanti (~22 nucleotidi) in grado di regolare negativamente e simultaneamente l'espressione di diversi geni attraverso la degradazione oppure mediante repressione trascrizionale dei loro mRNA *target*, legandosi alle regioni UTR ("untranslated region", regioni non tradotte) dell'mRNA (Rodríguez-Vicente A.E et al., *Oncotarget*. 2017) (Shahjahani M., et al., *Cell. Oncol.*2015). Queste molecole sono cruciali in diversi momenti fisiologici della vita cellulare (differenziazione, proliferazione, apoptosi, metabolismo) e svolgono un ruolo importante anche a livello dell'emopoiesi mieloide e linfocitaria. Ogni miRNA può teoricamente legare diverse centinaia di geni, ed ognuno di essi contiene siti di legame specifici per diversi miRNAs che possono cooperare tra di loro (Lawrie CH. Et al., *Br J Haematol*. 2012). Ad oggi, è ormai noto che i miRNA svolgono un ruolo importante nella patogenesi di varie neoplasie. Alterazione nei miRNA-15a / 16-1 sono associati al meccanismo patogenetico della LLC, ed hanno rappresentato la prima evidenza della correlazione tra miRNA e cancro (Rodríguez-Vicente A.E, et al., *Cancer Genet*. 2013). Calin e collaboratori hanno dimostrato la relazione tra delezione 13q14 e "down-regulation" di miR-15a/16-1, codificati in questa regione. Tale delezione comporta la perdita, e conseguente la ridotta espressione, di tali miRNA (Rodríguez-Vicente A.E, et al., *Cancer Genet*. 2013). Studi successivi, hanno dimostrato una correlazione inversamente proporzionale tra l'espressione di miR-15a/16-1 e quella di *BCL-2*, questi miRNA sembrano esercitare un'inibizione su *BCL-2* a livello post-trascrizionale. In condizioni fisiologiche, la mancata espressione di *BCL-2*, regolata dai due miRNAs, determina l'apoptosi, contrariamente l'aumentata espressione è responsabile di resistenza all'apoptosi. Nella LLC, in una percentuale considerevole di casi (circa il 68%), si assiste ad un'aumentata espressione di *BCL-2* secondaria alla delezione di miR-15a/16-1 che oltre a resistenza all'apoptosi, può anche determinare un'aumentata espressione dei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, tra cui *CCND2*, *CCND3* e *CDK4/6* (Shahjahani M., et al., *Cell. Oncol.*2015).

Esperimenti murini, hanno definitivamente dimostrato che tali miRNA svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi della LLC, infatti topi ingegnerizzati, portatori di delezione *target* nel *locus* dei miRNA-15a/16-1, sviluppano un disordine MBL e LLC simile (Klei U. et al., *Cancer Cell*.;2010).

Anche altri miRNAs hanno un ruolo riconosciuto nella patogenesi della LLC:

- miR-29b: agisce come soppressore tumorale, inibendo l'espressione di diversi proto-oncogeni, tra cui *TCL1*, *MCL1*, *CDK2/6*, *SP-1*, *DNMT3a* e *DNMT3B*. Una ridotta espressione di miR-29 è stata associata ad un fenotipo aggressivo, *IGHV* non mutato, sovra-espressione di *ZAP-70* e delezione di 11q23 (Shahjahani M., et al., *Cell. Oncol.*2015).
- miR-181: agisce come oncogene (oncomiR), è coinvolto nello sviluppo delle cellule B di LLC. E' stato dimostrato che la diminuzione dell'espressione di miR-181 provoca l'aumento dei livelli del *MCL1* e *BCL-2*, proteine anti-apoptotiche (Shahjahani M., et al., *Cell. Oncol.*2015).
- miR-34a: è un bersaglio trascrizionale diretto del *pathway* di *TP53*. La sua maggiore espressione porta all'apoptosi e all'arresto del ciclo cellulare attraverso la regolazione di proteine come *BCL-2*, *ciclina D1* e *E2*, *CDK4* e *c-MYC*. Diversi studi hanno dimostrato che la delezione o mutazione del gene *TP53* può causare una diminuzione dell'espressione di miR-34a, provando a sua volta un'alterazione del meccanismo di riparazione del DNA. Inoltre, è stato proposto il ruolo di miR-34a come indicatore di chemio-refrattarietà alla fludarabina in caso di ridotta espressione, anche in maniera indipendente dallo stato mutazionale di *TP53* (Lawrie CH. et al., *Haematol.*2013) (Shahjahani M., et al., *Cell. Oncol.*2015).
- miR-155: Ferrajoli et al, hanno dimostrato che un'aumentata espressione plasmatica e cellulare di questo miRNA comporta una ridotta risposta alla terapia e quindi un minor OS; esso è stato proposto come possibile indicatore dei casi di MBL che evolveranno in una LLC conclamata (Ferrajoli A, et al., *Blood* 2013).

In fine, data la relazione tra anomalie citogenetiche e miRNA, ad esempio un'aumentata espressione di miR-21 si associa a LLC aggressive caratterizzate dalla del(17p), essi sono diventati candidati interessanti sia come biomarcatori sia come bersagli terapeutici. Tuttavia, l'interesse per i miRNA nella LLC è emerso solo recentemente, per cui scoprire il legame tra i vari miRNA ed i loro bersagli genetici, nel contesto della biologia della LLC rimane una sfida importante. Ad oggi, essi rappresentano una tra le frontiere più interessanti nella ricerca della LLC (Rodríguez-Vicente A.E, et al., *Cancer Genet.* 2013).

1.7.7 L'espressione dell'enzima telomerasi e la lunghezza dei telomeri nelle cellule leucemiche di LLC.

Recentemente, Adam *et al.*, hanno dimostrato il valore prognostico della lunghezza dei telomeri (LT) in diverse tumori solidi ed ematologici (Adam R et al., *Exp Mol Pathol.* 2017). I telomeri sono delle strutture protettive specializzate, localizzati nelle regioni terminali dei cromosomi. Sono composti da sequenze esanucleotidiche (TTAGGG) ripetute in tandem a cui si associa un complesso di proteine di protezione. Durante i normali processi di replicazione cellulare, i telomeri vanno incontro alla perdita di circa 50-100 paia di basi per mitosi. Tale fenomeno viene continuamente riparato dalle telomerasi, enzimi particolarmente complessi, costituiti da almeno due componenti principali: una trascrittasi inversa telomerica (TERT) ed un RNA ad essa associato. Quando l'accorciamento telomerico, in un singolo

cromosoma, raggiunge dimensioni maggiori di un livello definito “critico”, la cellula non prolifera, andando incontro ad un processo di senescenza e poi di morte cellulare, attraverso l’attivazione dei *pathway* regolati da *ATM* e *TP53*. L’accorciamento dei telomeri avviene fisiologicamente con l’invecchiamento, soprattutto nei leucociti (Neal S. et al., *Hematology*.2010).

E’ ormai noto che i soggetti affetti da LLC, mostrano una lunghezza dei telomeri più corta rispetto ai soggetti sani, ed è stato rilevato che pazienti con alti livelli di TERT hanno una prognosi significativamente peggiore, rispetto ai casi con bassi o indeterminabili livelli di TERT (Thomay K. et al., *Ann Hematol* 2017). Pertanto l’analisi dell’attività telomerasica si è dimostrata altamente predittiva riguardo alla probabilità di sopravvivenza dei pazienti. Inoltre, recenti studi hanno riportato un’associazione tra telomeri corti e del(11q), del(17p) e a cariotipi con due o più anomalie citogenetiche. Dunque l’evoluzione a cariotipo complesso potrebbe essere determinata proprio dall’accorciamento dei telomeri e dall’anomalo funzionamento di *ATM* e *TP53*, in tal modo le cellule anomale bypassano la senescenza e l’apoptosi, acquistando un vantaggio proliferativo che consente non solo la sopravvivenza ma anche di evolvere in cloni maligni. Difatti, nel recente lavoro di Thomay *et al* è stato rilevato che la lunghezza dei telomeri è associate alla mutazione di *TP53* (Thomay K. et al., *Ann Hematol* 2017).

1.8 Anomalie citogenetiche rilevate mediante microarrays

Come riportato in letteratura, diversi gruppi hanno analizzato i campioni di LLC mediante diverse piattaforme di array-based comparative genomic hybriditation (aCGH). Tali lavori, hanno dimostrato che la complessità genomica della LLC era molto più ampia rispetto a quanto ritenuto per anni, rilevando numerose anomalie citogenetiche addizionali (Tab. 3).

Anomalie genetiche	Geni	References
1q23.3 loss		Edelman J. et al., 2012
2p24.3 gain	<i>REL</i> ,	Chapiro E. et al., 2010;
2p16.1 gain	<i>MYCN</i>	Rinaldi A. et al., 2011
3q26 gain	<i>PIK3CA</i>	Houldsworth J. et al., 2014
4p15.2-p14 loss		Messina et al., 2014
6q23 loss	<i>MYB</i>	Edelman J. et al., 2012
8p loss	<i>TNFRSF10A</i> , <i>TNFRF10B</i> , <i>MCPHI</i>	Rinaldi A. et al., 2011; Edelman J. et al., 2012
8q24 gain	<i>MYC</i>	Rinaldi A. et al., 2011; Edelman J. et al., 2012
10q loss		Edelman J. et al., 2012
15q15.1 loss	<i>MGA</i>	Edelman J. et al., 2012: Steven-Kroef M.J. et al., 2014
20q13 gain		Rodriguez A.E. et al., 2012
22q11 loss	<i>PRAME</i>	Gunn S.R. et al., 2009

Tabella 3. Sono riportate alcune delle anomalie citogenetiche addizionali rilevate mediante microarray

E' stato dimostrato che l'amplificazione sul 2p è presente nel 28% dei pazienti non trattati con stadio di malattia avanzato (Binet B/C) e pertanto è stato postulato che tale anomalia rappresenti un evento secondario associato ad una più breve OS ed ad un aumento del rischio di trasformazione nella sindrome di Richter (Chapiro et al., *Leuk Res* 2010). Anche lo studio di Rinaldi et al., su una casista di 147 pazienti, eseguito mediante SNP 6.0 ha rilevato un'associazione tra amplificazione 2p e prognosi infausta (Rinaldi et al, *Br J Haematol* 2011). Tale anomalia addizionale sembrerebbe essere associata a *IgHV* non mutato, ad un aumento dei livelli di LDH e a del(11q) (Rinaldi et al., *Br J Haematol* 2011). Inoltre, sebbene anomalie a carico del 6q erano già evidenti da studi di citogenetica classica (3-6%), gli arrays hanno dimostrato che tale lesione appare con una maggiore frequenza rispetto a quanto si credeva in precedenza, con un tasso che varia dal 3-17%.

Le anomalie a carico del cromosoma 8 (8p e 8q), sono state osservate principalmente in pazienti con la delezione del(17p) e sembrano essere associate ad un inferiore OS (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Rinaldi et al., hanno inoltre dimostrato che amplificazioni del cromosoma 8q, insieme al gain 2p, sono anomalie a prognosi infausta. Anche le delezioni del cromosoma 8p appare associata ad una prognosi sfavorevole, ma non con la stessa potenza statistica delle due lesioni appena citate (Rinaldi et al, *Br J Haematol* 2011). Oltre a queste anomalie, che appaiono ricorrenti con l'analisi dei microarrays, diversi autori hanno osservato che i pazienti con un numero ≥ 3 CNAs (cariotipo complesso), mostrano una minore TTFT, una peggiore risposta alla terapia ed una minore mediana di OS (Fig. 5) (Gunnarson et al., *Haematologica* 2011).

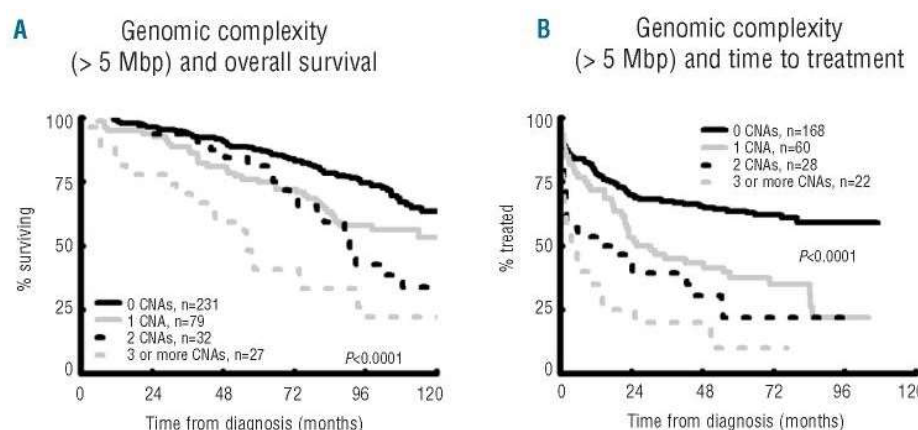


Figura 5 L'OS e TTFT è più breve nei pazienti con più di 3 anomalie (cariotipo complesso) (Gunnarson et al., *Haematologica* 2011).

In particolare, due importanti lavori hanno anche riportato una stretta associazione tra cariotipo complesso, rilevato mediante microarrays, e anomalie ad alto rischio, quali del(11q) e del(17p) e/o mutazione di *TP53*

(Edleman et al., *Blood* 2012) (Ouillette et al., *Blood* 2011). La complessità genomica sembrerebbe essere un marker di progressione di malattia (Gunnarsson et al., *Haematologica* 2011).

L'analisi mediante microarray ha anche dimostrato, seppure in rari casi, la presenza di cromotripsidi, definita come la frammentazione di un cromosoma, o parte di esso, in molti segmenti genetici, che successivamente si riuniscono, con un ordine diverso dalla condizione originale (Edleman et al., *Blood* 2012). Lo studio del genoma della LLC con tali metodiche potrebbe aiutare a definire il ruolo prognostico delle nuove, e apparentemente ricorrenti, anomalie citogenetiche con il fine di migliorare la stratificazione del rischio.

Infine piattaforme che combinano in un solo esperimento analisi quantitativa del numero di copie alleliche e analisi del genotipo, ovvero metodiche che combinano oligo- o BAC-arrays con gli SNPs arrays, hanno svelato una nuova anomalia genetica per lungo tempo sottostimata: Copy Neutral loss of heterozygosity (CN-LOH), anche nota come "Acquired Uniparental Disomy" (aUPD) (Tuna et al., *Trends Mol Med.* 2009). Tale fenomeno consiste in una perdita di eterozigotità, senza una concomitante variazione del numero di copie alleliche, ragion per cui tutte le altre metodiche, FISH, citogenetica convenzionale ed aCGH, non sono in grado di rilevarla. Rispetto alla UPD costituzionale, le conoscenze dei meccanismi che guidano la aUPD non sono ancora del tutto chiari (Wang et al., *Exp Hematol.* 2016). Probabilmente tale fenomeno potrebbe essere causato da un tentativo di correzione che la cellula mette in atto in seguito alla perdita di materiale genomico, o in seguito a sbilanciamento cromosomico (Tuna et al., *Trends Mol Med.* 2008). Secondo altre ipotesi, errori durante la ricombinazione mitotica tra cromosomi omologhi potrebbero essere responsabili dell'insorgenza di CN-LOH (Figura 6) (O'Keefe et al., *Blood*, 2010).

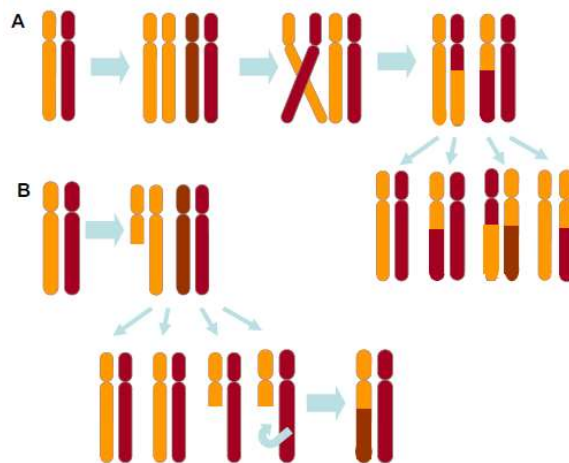


Figura 6 Meccanismi che possono portare alla formazione di aUPD. (A) Dopo ricombinazione genica tra cromosomi omologhi, in base a come sono segregati nelle cellule figlie si può generare CN-LOH. (B) CN-LOH può derivare da delezione seguita da un evento di duplicazione della regione cromosomica mancante che usa l'omologo come template (O' Keefe et al., *Blood* 2010).

E' ovvio che mediante UPD, la cellula acquisisce un vantaggio evolutivo diventando sempre più aggressiva, in quanto tale fenomeno potrebbe determinare la selezione dell'allele più vantaggioso. Difatti le

conseguenze della perdita di eterozigotità potrebbero essere: omozigosi di un protooncogene o di oncosoppressore mutato, omozigosi di SNPs, omozigosi di una regione deleta o di miRNA (Tuna et al., *Trends Mol Med.* 2009). Nel ambito della LLC sebbene la aUPD risulti un evento raro sembra essere piuttosto ricorrente nei siti clinicamente rilevanti ossia a livello 13q14.2, 17p13.1 e a livello 11q22.3 (Edelman et al *Blood*, 2012). E' stato dimostrato che la CN-LHO a livello del 17p13 abbia una notevole rilevanza clinica (CN-LOH 17p) essendo responsabile di *outcome* sfavorevole (Malek S.N., *Oncogene* 2013). Gunnarson et al., nella loro ampia casistica hanno rilevato la presenza di CN-LOH in 3.5% pazienti, esclusivamente a livello della regione 13q14. La notevole frequenza di tale delezione nella loro casistica ha portato a speculare che probabilmente la aUPD potrebbe essere un importante evento patogenetico della LLC. Difatti sempre gli stessi autori, mediante un'analisi longitudinale di 24 pazienti, hanno dimostrato che la CN-LOH in 13q, responsabile di delezione in omozigosi dei locus contenente i mir15a/16-1, compariva esclusivamente alla diagnosi e mai durante l'evoluzione clonale (Gunnarson et al, *Haematologica*, 2011).

Dunque l'identificazione della CN-LOH potrebbe aiutare sia a comprendere meglio i meccanismi alla base della patogenesi nella LLC ma anche a definire il suo ruolo prognostico, in quanto le sole anomalie citogenetiche ricorrenti non possono spiegare appieno l'eterogeneità biologica e clinica della malattia. L'esistenza di altri meccanismi molecolari alla base della LLC potrebbe essere di fondamentale importanza per comprendere il motivo per cui pazienti con un profilo genetico favorevole in realtà mostrano una rapida progressione di malattia, fallimento del trattamento e *outcome* sfavorevole.

1.9 Ruolo delle NGS nel *setting* clinico della LLC

Le tecniche di Next-generation Sequencing (NGS) hanno fornito una migliore conoscenza della complessità genetica della LLC. Dal 2011 con il primo studio di Whole-genome sequencing (WGS), in cui venivano individuate mutazioni ricorrenti, sono stati fatti grandi passi avanti (Figura 7) (Rodriguez-Vincente A.E. et al., *Oncotarget*. 2017)

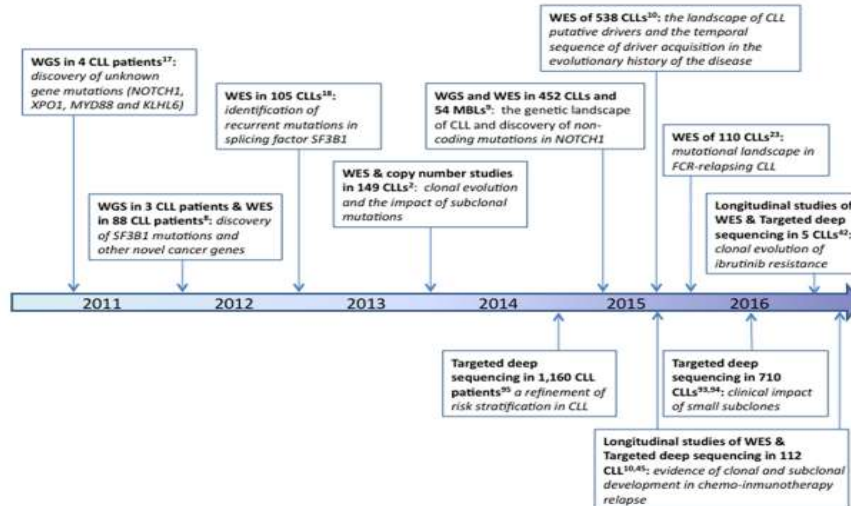


Figura 7 Cronologia delle più importanti scoperte ottenute con la tecnica di NGS nella LLC (Rodriguez-Vincente A.E. et al., *Oncotarget*. 2017).

Gli studi di NGS hanno rilevato, innanzitutto, che il profilo genetico delle LLC è caratterizzato da poche mutazioni ricorrenti ma da una lunga lista di geni mutati a bassa frequenza. Inoltre, poiché tale metodiche forniscono una visione dell'intero genoma, hanno confermato la notevole eterogeneità intratumorale tra le cellule maligne di uno stesso paziente (Rodriguez-Vincente A.E. et al., *Oncotarget*. 2017). L'introduzione delle metodiche di NGS ha permesso, inoltre, di identificare la presenza di mutazioni subclonali nella LLC (da <20% a <1% delle cellule) a livello di vari geni (*P53*, *NOCTH*, *SF3B1*, *BIRC3* e *ATM*). Sembra, però, che solo le mutazioni subclonali in *TP53* abbiano un impatto sulla prognosi. Sono state identificate nel 9% dei casi alla diagnosi e appaiono responsabili di una prognosi tanto severa quanto quella determinata da mutazioni o delezioni clonali del gene (Rossi et al, *Blood* 2014). Dal punto di vista patogenetico questi subcloni con mutazioni sfavorevoli svolgono un ruolo di *drivers* nella fase di progressione, venendo selezionati ed espandendosi durante il decorso della malattia, specialmente dopo trattamento, e causando resistenza al trattamento stesso (Landau et al, *Cell* 2013).

Ad oggi, le NGS rappresentano un potente strumento da utilizzare nel contesto di studi clinici prospettici per la valutazione di aberrazioni clonali e sottoclonali in relazione alla terapia e all'*outcome*.

1.10 Evoluzione clonale nella LLC

La LLC, come la maggior parte delle neoplasie, mostra una notevole eterogeneità sia *intertumorale* (variabilità tra neoplasie di una stessa origine nei diversi pazienti) che *intratumorale* (all'interno di uno stesso tumore gruppi di cellule diverse mostrano una non-uniformità morfologica, dello status genetico/epigenetico e dell'espressione di marker cellulari) (Gerashchenko T.S. et al., *Biochemistry* 2013) (Rodriguez-Vincente A.E. et al., *Oncotarget*. 2017). Sebbene l'ITH (eterogeneità intratumorale) era nota

da tempo, solo nella metà degli anni novanta i primi studi di citogenetica convenzionale e FISH hanno fornito evidenze tangibili della presenza in un medesimo tumore di multipli cloni con un patrimonio genetico differente (Gerashchenko T.S. et al., *Biochemistry* 2013). Inoltre, tale non uniformità genetica sembrerebbe favorire un altro insidioso evento della carcinogenesi: **l'evoluzione clonale** (CE, Clonal Evolution) con un importante risvolto per la progressione clinica della malattia e per la risposta alla terapia. Dunque l'ITH potrebbe rappresentare il punto di partenza del processo di evoluzione clonale inteso come il fenomeno mediante il quale le cellule cromosomicamente instabili accumulano stocasticamente nel tempo alterazioni genetiche. Queste nuove alterazioni potrebbero fornire un vantaggio evolutivo generando cloni via via sempre più *fitter*, ovvero in grado di espandersi in maggior misura. In particolare stimoli esterni, come la pressione esercitata della terapia, potrebbero favorire la selezioni di tali cloni *fitter*, inducendo una maggiore aggressività della neoplasia. Tale teoria, nota **come modello stocastico o gerarchico**, segue il dogma evolucionistico darwiniano della selezione naturale (Greaves M et al., *Nature* 2012).

Alla fine degli anni '80 Han T. e collaboratori furono i primi ad introdurre il concetto di CE nella LLC dimostrando la comparsa di nuove anomalie cromosomiche durante il corso della malattia (Han T. et al., *Cancer Genet Cytogenet* 1986). Agli inizi del XXI secolo diversi studi mediante FISH hanno confermato la CE nei campioni di LLC (Shanafelt T.D et al., *J Oncol.*, 2006)(Cavazzini F. et al., *Leuk Lymphoma* 2012). L'evoluzione clonale nella LLC è stata osservata nel 12-43% dei casi (Wawrzyniak E. et al., *Eu J of Haemtol* 2013). In questo contesto la LLC fornisce un ottimo modello di studio in quanto la lenta crescita delle cellule maligne, rispetto ad altre neoplasie B, fornisce un'ampia finestra per l'osservazione del processo di evoluzione clonale, dal momento che possono servire mesi o anni affinché un nuovo clone si sostituisca al clone precedente. Dal punto di vista citogenetico l'evoluzione clonale nella LLC è stata definita come la comparsa tardiva di alterazioni a carico dei cromosomi 17p, 11q, 6q,12 e del(13q) ed è associata a markers di malattia attiva, come la positività di ZAP-70 e lo stato non mutato di *IgVH* (Ouillette et al, *Clin Cancer Res* 2013).

Tuttavia solo recentemente, grazie al lavoro di Landau et al., eseguito mediante metodiche di NGS, sono stati meglio definiti i meccanismi alla base della dinamicità clonale nella LLC. Landau e collaboratori, difatti, hanno dimostrato che, non solo la presenza e la diversità dei singoli cloni intratumorali condizionano il decorso clinico e la differente risposta alla terapia, ma essa è anche influenzata dal tipo di dinamica evolucionistica (Landau D.A., et al., *Cell* 2013). Sono stati, dunque, proposti 3 distinti periodi di progressione della LLC. Un primo periodo di trasformazione in cui mutazioni clonali, dette "eventi passeggeri" possono accumularsi nella cellula, che diventerà la cellula "fondatrice" dell'evento leucemico (età, ipermutazioni somatiche). In un secondo periodo in una di queste cellule, compaiono "*founding CLL-mutations*", dette anche "driver mutation", che sono prevalentemente lesioni clonali (es. del(13q), la trisomia 12 e *MYD88*) che conferirebbero un vantaggio evolutivo alle cellule B dando inizio alla trasformazione leucemica. La frequenza di questi eventi aumenta con l'età del paziente. Nel terzo periodo della progressione della malattia si innestano mutazioni in singoli sub-cloni (*ATM*, *TP53* o *RAS*) che si

espandono in relazione a fattori intrinseci (microambiente, stimolazione antigenica), ed estrinseci (competizione interclonale e terapia).

Inoltre gli studi di NGS hanno dimostrato due comuni *pattern* di evoluzione della LLC:

1. Evoluzione lineare: un clone dominante acquisisce mutazioni driver durante il corso della malattia, che si accumulano alle anomalie iniziali.
2. Evoluzione branching: diversi cloni coesistono e si evolvono parallelamente durante il corso della malattia (Landau D.A., et al., *Cell* 2013).

L'evoluzione branching, sembrerebbe essere associata maggiormente ad evoluzione clinica della LLC ed ad un decorso clinico sfavorevole, probabilmente perché la diversità genetica generata consentirebbe una selezione più efficiente del clone *fitter*. Tuttavia è anche da sottolineare che nel 10% dei pazienti con evoluzione lineare è stata osservata evoluzione in Linfoma Diffuso a Grandi Cellule (DLCL) e a Sindrome di Richter (Roos-Weil D. et al., *Am J Hematol* 2016).

Al momento ciò che è chiaro è che, in alcuni casi, multipli sub-cloni possono mantenere le loro relative proporzioni, uno rispetto all'altro, per molti anni, ovvero mantenersi in "clonal equilibrium"; in altri casi, invece, sub-cloni individuali possono emergere e divenire dominanti sugli altri e determinare una situazione di "clonal competition". La proporzione di pazienti in ognuna di queste due categorie è verosimilmente dipendente dallo stadio della malattia (Guièze R., et al., *Blood* 2015).

Tuttavia gli studi eseguiti mediante piattaforme di NGS sebbene abbiano svelato i meccanismi molecolari alla base dell'evoluzione clonale non sono facilmente applicabili alla pratica clinica, per cui ad oggi ancora non è chiaro l'effetto della CE sul decorso della malattia e sulla risposta alla terapia. Sono, pertanto necessari, studi su ampie casistiche *real-life*.

1.11 Cenni Terapia

Per molti anni la LLC è stata considerata una malattia cronica non curabile e l'unico trattamento disponibile era rappresentato da chemioterapia a base di fludarabina, con o senza corticosteroidi. Negli ultimi anni si è assistito a diversi cambiamenti dell'algoritmo usato per il trattamento della LLC. Agli inizi degli anni '50 il trattamento d'elezione era la chemioterapia con agenti alchilanti. Sulla base delle esperienze nel campo dei linfomi a basso grado, si è inizialmente approcciati a terapie con combinazioni di chemioterapici quali CHOP (Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina, Prednisone) o COP (Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone). Tuttavia sebbene essi abbiano consentito di raggiungere una risposta completa non hanno dimostrato un miglioramento della sopravvivenza a fronte, peraltro, di una maggiore tossicità. Attualmente rappresentano un'opzione utilizzabile nei pazienti ad alto rischio (Baliakas P. et al., *Am. J. Hematol.* 2015).

Dalla metà degli anni ottanta, il trattamento di prima scelta per gran parte dei casi di LLC era rappresentato dall'uso degli analoghi delle purine come la fludarabina, pentastatina. Negli anni 2000, ha invece preso piede la chemioimmunoterapia fino ad arrivare, ad oggi, in cui è stata introdotta la *targeted therapy* che sfrutta nuove molecole bersaglio per i meccanismi biologici che tengono in vita le cellule leucemiche (Rai et al., *Am. J. Hematol.* 2016).

Più precisamente per i pazienti con leucemia linfatica cronica è possibile distinguere tre punti temporali cruciali, definiti come “punti di decisione”:

- Il momento della diagnosi
- Il momento della progressione
- Il momento della recidiva, quando è richiesto un trattamento di seconda linea (Baliakas P. et al., *Am. J. Hematol.* 2015)

Nella pratica clinica, come riportato nelle linee guida IW-CLL, i pazienti asintomatici nei primi stadi della malattia (Rai 0, Binet A), non vengono sottoposti a trattamento ma solo monitorati (strategia di “*watch and wait*”) a meno che essi non mostrino segni di progressione di malattia o sintomi ad essa correlati. Difatti, diversi studi hanno dimostrato che il trattamento di pazienti nei primi stadi della malattia non risulta in un beneficio in termini di sopravvivenza. Invece i pazienti con alto o intermedio rischio, in base alla stadiazione Rai e Binet, possono beneficiare dell'inizio immediato del trattamento; comunque anche tra questi pazienti in assenza di sintomi correlati alla malattia si predilige una strategia di *watch and wait* fino all'eventuale comparsa di segni di progressione o di sintomatologia LLC correlata (anemia e/o trombotopenia, progressiva o sintomatica o massiva splenomegalia/linfadenopatia, progressiva linfocitosi, perdita di peso involontaria >10% in meno di 6 mesi, costante senso di affaticamento, febbre e sudorazioni notturne senza evidenti infezioni) (Hallek M. et al., *Blood* 2008).

Ad oggi, per il trattamento della LLC è possibile distinguere due strategie terapeutiche: la monoterapia e la combinazione di più agente terapeutici (Hallek M. et al., *Am J Hematol* 2017).

La mono terapia include:

- **Agenti citostatici** che comprendono: agenti alchilanti, tra questi il Clorambucile che per diversi anni ha rappresentato il *gold standard* per il trattamento di prima linea essendo poco costoso, con pochi effetti tossici e di facile somministrazione (somministrazione orale); analoghi delle purine: Pentostatina, Cladribina (2-CdA), e Fludarabina (induce il maggior tasso di OS rispetto agli altri regimi terapeutici a base di agenti alchilanti o corticosteroidi); Bendamustina, ha un doppio meccanismo d'azione, antimetabolita ed alchilante. Questo agente ha dimostrato un'ottima attività terapeutica, ma al contempo presenta molti effetti tossici (Hallek M. et al, *Am J Hematol* 2017).
- **Anticorpi monoclonali** sono diretti contro antigeni espressi sulla membrana dei linfociti dei quali inducono la lisi cellulare. Solitamente sono impiegati in schemi terapeutici di combinazione. Tuttavia, attualmente si

sta valutando il beneficio di somministrarli come singoli agenti in terapia di mantenimento (Hallek M., *Am J Hematol* 2017). I principali sono: anticorpi anti-CD20: Rituximab, Ofatumumab, Obinutuzumab. Tra questi, il secondo mostra una notevole affinità per l'anticorpo CD20 ed un maggiore effetto citotossico per le cellule leucemiche rispetto al Rituximab. Recentemente, la Food and Drug Administration (FDA) e l'agenzia europea per i medicinali (EMA), hanno approvato tale molecola nel trattamento di pazienti refrattari alla Fludarabina e all'Alemtuzumab. Inoltre, anche Obinutuzumab appare un potente agente terapeutico per la LLC (Hallek M., *Am J Hematol* 2017); anticorpi anti-CD52: Alemtuzumab (Campath-1H), diretto contro i linfociti B, T, NK e monociti. Nonostante la sua dimostrata efficacia in pazienti con caratteristiche citogenetiche ad alto rischio (del(11q) e del(17p) al momento è disponibile solo per uso compassionevole (Hallek M., *Am J Hematol* 2017).

- **Targeted therapy.** In cui è possibile distinguere: inibitori delle chinasi coinvolte nel *pathway* del BCR *signaling* ed inibitori di *BCL-2*. Appartengono alla prima categoria: Idelalisib: È un inibitore a somministrazione orale, selettivo e reversibile della subunità catalitica p110 delta della isoforma PI3Kδ (class I phosphatidylinoditol 3-kinases). L'inibizione di tale subunità promuove l'apoptosi delle cellule di LLC ed inibisce le loro interazioni con il microambiente (Rai KR et al., *Am. J. Hematol.*2016). Ibrutinib: inibitore irreversibile dell'enzima BTK (tirosina chinasi di Bruton), attraverso il legame alla cisteina 481 all'interno del sito di legame dell'ATP del dominio della chinasi BTK. Le cellule di LLC sono così indotte ad apoptosi (Rai KR et al., *Am. J. Hematol.*2016). Acalabrutinib: inibitore più selettivo ed irreversibile di BTK. Sebbene siano necessari altri *trials*, mostra risultati promettenti con un alto tasso di risposta in pazienti in recidiva di LLC (Hallek M., *Am J Hematol* 2017). Un esempio di inibitore di BCL-2, è rappresentato dal Venetoclax (ABT-199): farmaco a somministrazione orale che blocca la funzione delle proteine Bcl-2, regolatori chiave del processo apoptotico. E' stata dimostrata l'efficacia di monoterapia a base di Venetoclax non solo tra pazienti recidivanti e refrattari, ma anche tra i pazienti con caratteristiche prognostiche avverse, quali del 17p e *IgHV*-non mutato (Hallek M., *Am J Hematol* 2017).

Dunque, per i pazienti con del(17p) o mutazioni di *TP53*, la *targeted therapy*, in particolare l'Ibrutinib, mostra una notevole efficacia. Alla luce di tali considerazioni emerge la necessità di rilevare la presenza o l'assenza di difetti citogenetici non solo per definire la prognosi individuale dei pazienti ma anche per definire la migliore strategia terapeutica da intraprendere e per predire la risposta al trattamento (Strati P. et al., *Mayo Clin Proc* 2018).

- **Farmaci immunomodulatori.** Un esempio è la Lenalidomide che mostra risultati incoraggianti per il trattamento di pazienti con del(17p) e soprattutto la combinazione con Rituximab sembrerebbe aumentare la risposta senza un incremento della citotossicità (Hallek M., *Am J Hematol* 2017).

L'altra importante strategia per il trattamento della LLC è rappresentata dalla **chemio terapia combinata**. Infatti, è stato presto dimostrato che la combinazione degli agenti citostatici con altre molecole terapeutiche

mostrava un miglioramento del tasso di risposta globale e di PFS rispetto alla terapia con l'agente singolo (Rai KR et al., *Am. J. Hematol.* 2016). Le prime evidenze sono state suggerite da *US Intergroup Trial* che hanno dimostrato che la combinazione di Ciclofosfamide e Fludarabina (FC) era in grado, rispetto alla sola Fludarabina, di fornire un maggior tasso di risposta globale (74,3% vs 59,5%), di risposta completa (23,4% vs 4,6%) ed un aumento tasso di sopravvivenza libera da malattia (31,6 vs 19,2 mesi). Di contro, la combinazione dei due farmaci ha comportato una maggiore tossicità midollare, con maggior incidenza di neutropenia, anemia e trombocitopenia (Flinn IW et al., *J Clin Oncol* 2007). Il primo brillante esempio che ha dimostrato l'efficacia della combinazione di più agenti terapeutici è rappresentato dall'anticorpo monoclonale **Rituximab**; difatti utilizzato come singolo agente non ha mostrato un significativo miglioramento del tasso di risposta globale, mentre la combinazione con Fludarabina ha portato ad un netto miglioramento nel tasso di risposta (Hallek M., *Am J Hematol* 2017). Un enorme passo avanti per il trattamento della LLC è avvenuto nel 2000 quando è stato introdotto il regime FCR (Fludarabina, Ciclofosfamide e Rituximab) dando inizio all'era della chemio-immunoterapia (Rai KR et al., *Am. J. Hematol.* 2016).

Ad oggi, lo schema chemio-immunoterapico FCR è ritenuto il miglior trattamento per pazienti affetti da LLC in buone condizioni generali e che non presentano la delezione 17p13 (Rai KR et al., *Am. J. Hematol.* 2016). L'associazione del Rituximab alla Fludarabina e alla Ciclofosfamide ha mostrato ottimi risultati sia come terapia *front-line* ma anche nei casi recidivanti o refrattari a terapie precedenti (Wierda W. et al., *J Clin Oncol* 2005).

Ad oggi sono in corso di studi di combinazione che associano i più recenti anticorpi monoclonali con i chemioterapici, oppure combinazioni a base di agenti *targeted* ed anticorpi monoclonali (es. Idelalisib + Rituximab, Ibrutinib + Rituximab, Ibrutinib + Ofatumumab, Venetoclax +Rituximab, Venetoclax + Binutuzumab) (Hallek, *Am J Hematol* 2017).

In particolare recentemente si sta cercando di comprendere anche il potenziale ruolo di un innovativo trattamento che comporta la rinfusione di una bassa dose di cellule CAR T – modificate, in pazienti con LLC refrattaria. I primi risultati sono promettenti, ma sono necessari altri studi per definire l'uso delle cellule CAR T nel trattamento della LLC (Hallek M., *Am J Hematol* 2017).

Un'ultima considerazione riguarda il potenziale ruolo del **trapianto di cellule staminali** nel trattamento della LLC ancora non bene chiaro. Il trapianto autologo ha un alto tasso di risposte complete ma è gravato da un'elevata probabilità di recidiva. Sono necessari ulteriori studi che ne confrontino il rapporto rischio-beneficio rispetto alla chemioterapia. Il trapianto di cellule staminali allogenico (allo-HSCT) è indicato nei pazienti refrattari/recidivati con delezione e/o mutazioni di *TP53* una volta raggiunta la remissione di malattia in seguito al trattamento (Strati P. et al. *Mayo Clin Proc.*, 2018). Comunque, pur essendo l'unica strategia potenzialmente in grado di guarire dalla malattia, è fortemente limitato dall'età del paziente che non può essere superiore ai 50 anni (Moreno C. et al., *J Clin Oncol* 2005).

1.12 Panorama degli schemi prognostici proposti.

Gli schemi prognostici proposti da Rai e Binet, più di 40 anni fa, sebbene, ad oggi rappresentino ancora lo strumento d'elezione per definire diagnosi e prognosi dei pazienti con LLC, mostrano tuttavia numerosi punti deboli che fanno vacillare la loro validità. Essi infatti, essendo stati sviluppati nell'era in cui il meccanismo patogenetico della LLC era completamente ignoto, si focalizzano esclusivamente sulle caratteristiche cliniche del paziente senza tener presente la complessità biologica della neoplasia (Delgado et al., *Am J Hematol* 2017). Ciò spiega l'evidente disomogeneità in termini di prognosi fra i pazienti appartenenti ad una medesima classe di rischio. Inoltre la loro utilità è fortemente limitata nei pazienti ai primi stadi della malattia perché non consentono di definire il rischio di progressione di ciascun paziente al momento della diagnosi e non sono in grado di predire la risposta al trattamento. Tale aspetto è particolarmente importante, in quanto, per la sempre crescente attenzione ai controlli emocitometrici, la percentuale di pazienti ai primi stadi della malattia è considerevolmente aumentata, rispetto all'era in cui Rai e Binet hanno disegnato il loro algoritmo prognostico (Baliaska P. et al. *Leukemia* 2016).

Alla luce di ciò, tali sistemi prognostici non possono costituire l'unico strumento per predire l'*outcome* clinico (Zenz T. et al, *Best Pract Res Clin Haematol* 2010). Difatti, come ampiamente descritto nei precedenti paragrafi, per far fronte a queste problematiche sono stati individuati diversi marker prognostici, che riflettono le caratteristiche biologiche del clone leucemico, e quindi potenzialmente utili per la stratificazione prognostica. Inoltre negli ultimi anni diversi gruppi di studio hanno cercato di individuare non solo i migliori indicatori prognostici ma anche di proporre modelli in grado di stratificare nel modo più accurato possibile i pazienti.

Un primo tentativo di stratificazione prognostica è stato proposto nel 2007 da Wierda e collaboratori (Wierda WG, et al., *Blood* 2007) che hanno sviluppato un indice prognostico combinando i dati clinici e sierologici di 1674 pazienti affetti da LLC, afferiti al “*MD Anderson Cancer Centre*”, che non necessitavano di un trattamento alla prima visita o entro 3 mesi successivi. Su base multivariata, sei parametri (sesso maschile, età, livelli di $\beta 2$ microglobulina, il numero delle aree dei linfoidi coinvolte, conta assoluta dei linfociti e stadio Rai) sono stati incorporati in un indice, noto anche come **normogramma**, che ha individuato tre gruppi di rischio (basso, medio e alto), significativamente diversi riguardo all'OS. Sebbene tale modello sia stato successivamente validato da due distinti gruppi (Gentile M. et al., *Br J Haematol* 2014) (Shanafelt TD, *Cancer* 2009) presenta, comunque, delle criticità. Innanzitutto, si basa esclusivamente su parametri che riflettono il carico tumorale, similmente ai sistemi di stadiazione clinica Rai e Binet, senza tener conto del *background* biologico della LLC. Per tale ragione la sua utilità si limita solo al momento della diagnosi di LLC e di MBL (Baliaska P. et al. *Leukemia* 2016). Particolare interesse è stato rivolto anche al modello prognostico di Rossi e collaboratori basato esclusivamente su dati genetici, integrando al sistema gerarchico convenzionale le mutazioni ricorrenti. Tali autori hanno ristratificato circa

il 20% dei pazienti a basso rischio, secondo il modello di Dohner, nella classe prognostica ad alto rischio perché portatori di mutazioni ad *outcome* sfavorevole (mutazioni in *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* e distruzione di *BIRC3*) (Rossi et al., *Blood*, 2013). Sono state distinte quattro classi: (I) i pazienti ad alto rischio, con anomalie di *TP53* e/o *BIRC3*, (II) i pazienti a rischio intermedio, che presentavano mutazioni di *NOTCH1* e/o *SF3B1*, e/o del(11q), (III) pazienti a basso rischio, con trisomia 12 o nessun aberrazioni, e (IV) i pazienti a molto basso rischio, con la del(13q) come unica anomalia (Fig. 8).

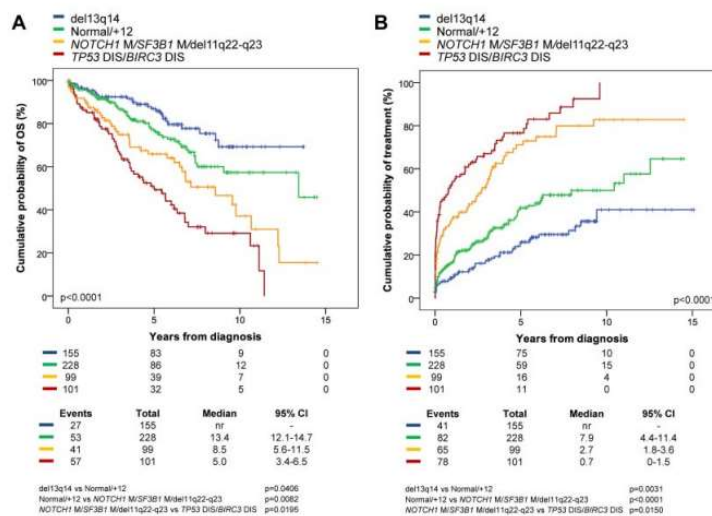


Figura 8 A) OS dei pazienti appartenenti alle nuove categorie di rischio basate sulla combinazione delle alterazioni citogenetiche classiche e delle mutazioni genetiche. **B)** Probabilità di progressione della LLC con necessità di trattamento in accordo alle linee guida IW-CLL(Rossi et al., *Blood*, 2013).

Il modello è stato validato da uno studio successivo che ha analizzato 202 pazienti per più due anni dimostrando che esso ha un impatto sulla prognosi nonostante l'eventuale evoluzione clonale (Baliaska P. et al. *Leukemia* 2016). Tuttavia, altri studi hanno rilevato risultati discordati rispetto allo studio di Rossi e collaboratori, probabilmente a causa del *set* di geni considerati, della sensibilità della tecnica usata e alla coorte di pazienti analizzati (Fabbri G. et al., *Nat Rev Cancer*. 2016). Inoltre tale modello appare statisticamente debole in quanto il C-index calcolato (C=0.642) non raggiunge il valore soglia considerato come *cut off* per definire un approccio clinicamente valido.

Ad oggi, il modello proposto dal consorzio internazionale (International CLL-IPI working group) integrando i dati genetici, molecolari, immunologici, sierologici e clinici, sembra essere l'approccio più vantaggioso. Sono stati individuati 5 fattori prognostici indipendenti: lo status di *TP53* (no mutato vs del(17p-) e/o mutazione), lo status mutazionale di *IgHV*, la concentrazione sierica di β 2-microglobulina (≥ 3.5 mg/L vs ≤ 3.5 mg/L), lo stadio clinico (Binet A o Rai 0 vs Binet B-C vs Rai I-IV) e l'età del paziente (≥ 65 vs ≤ 65). Ad ognuno di questi fattori, viene associato uno score che varia da 0 a 6, la somma definisce l'indice prognostico CLL-IPI, in base al quale i pazienti sono suddivisi in 4 classi di rischio: basso rischio (score 0-1), rischio intermedio (score 2-3), ad alto rischio (score 4-6) e rischio molto elevato (score 7-10)

(Fig. 9) (Bahlo J, et al., *Haematologica* 2015 (Fig.9). Tuttavia, l'età media dei pazienti valutati era di 61 anni, quindi significativamente inferiore rispetto all'età media dei pazienti con LLC.

Prognostic factor	CLL International Prognostic Index*	
		Points
FISH	del17p/ TP53 mutation	4
Serum β 2M	>3.5 mg/dL	2
Rai stage	I-IV	1
IGHV mutation status	Unmutated	2
Age, years	>65	1
CLL International Prognostic Index		
Risk category	Composite risk score**	5-year OS
Minimal risk	0–1	93%
Low risk	2–3	79%
Intermediate risk	4–6	64%
High risk	7–10	23%

Figura 9 CLL-international prognostic index (CLL-IPI). *Seminars in Oncology* 2016

Inoltre un recente lavoro ha semplificato questo algoritmo, riducendo le classi prognostiche da quattro a tre, basando la stratificazione esclusivamente su due soli marker, ovvero lo stato mutazionale dei geni *IgHV* e le anomalie citogenetiche ricorrenti (Delgado J. Et al., *Am J Hematol.*, 2017). Quest'ultimo modello è stato successivamente validato da un gruppo italiano, su una casistica di 698 pazienti ai primi stadi della malattia (Rai 0/1 e Binet A) (Reda G. et al., *Am J Hematol.*, 2018) con risultati promettenti.

Tuttavia, nessuno di questi tre modelli prende in considerazione una caratteristica che sembra diventare sempre più rilevante nella LLC: l'eterogeneità genetica intratumorale (ITH). Un recente lavoro, ha dimostrato che, nell'ambito del modello prognostico convenzionale, nei gruppi a prognosi favorevole e neutra, ovvero quelli con del(13q) e/o trisomia 12 e/o t(14q32), si osserva un peggioramento nell'OS qualora tali anomalie si presentino concomitanti; inoltre nei gruppi a prognosi sfavorevole, ovvero quelli con delezione di *ATM* o di *TP53*, i pazienti con un clone sfavorevole come "minor" mostravano un inatteso vantaggio di sopravvivenza rispetto ai pazienti con un clone sfavorevole come "major", dove per "major clone" si intendeva il clone con la percentuale massima di cellule coinvolte, se la discrepanza tra le due aberrazioni era maggiore del 30% e per "minor clone" se la percentuale di cellule coinvolte era minore. Pertanto, alla luce di tali considerazioni, Yi e collaboratori hanno proposto un nuovo modello, in base al quale, i pazienti venivano classificati in 3 classi prognostiche (Yi S. et al., *Genet Med*, 2016)(Fig. 10):

1. **Favorevole:** pazienti senza nessuna aberrazione cromosomica o con la sola del(13q) oppure con un *minor unfavorable clone* in presenza di un *major favorable clone*.
2. **Intermedio:** pazienti con trisomia 12 o con t(14q32), e pazienti con meno di 3 aberrazioni favorevoli/intermedie co-presenti, ovvero +12 e/o t(14q32) e/o del(13q).

3. **Sfavorevole:** pazienti con un clone maggioritario sfavorevole [del(11q), del(17p)] o con sole anomalie sfavorevoli oppure con contemporanea presenza delle tre aberrazioni definite favorevoli/intermedie, ovvero +12, t(14q32) e del(13q).

Ciò è stato stabilito in seguito alla dimostrazione che i pazienti con contemporanea presenza di del(13q) e trisomia 12 mostravano una OS simile ai pazienti con sola trisomia 12, mentre i pazienti con del(13q), trisomia 12 e t(14q32) concomitanti presentavano OS, TTFT e PFS sfavorevole rispetto ai pazienti con meno di tre anomalie (Fig. 10) (Yi S. et al., *Genetics in Med.*, 2016). D'altro canto essi hanno constatato che nel gruppo di pazienti a prognosi sfavorevole, ovvero quelli con del(17p) e/o del(11q), non è tanto il tipo di anomalia ad avere un impatto sull'outcome ma ciò dipende dalla diversa composizione clonale: *minor unfavorable clone* con *major favorable clone* è indice di buona prognosi.

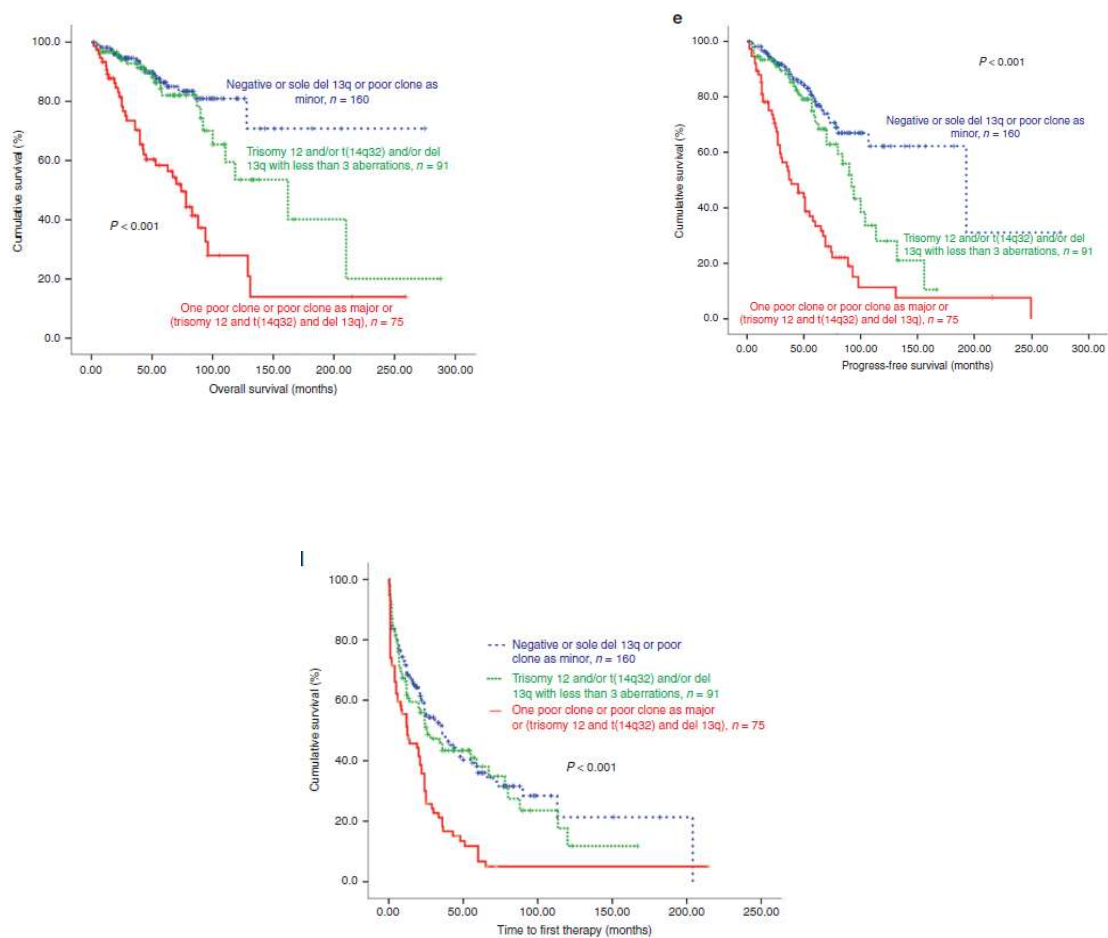


Figura 10 Curve di sopravvivenza calcolate per OS (**sinistra**), PFS (**destra**), TTFT (**in basso**) del nuovo modello prognostico che integra il fenomeno dell'ITH (Yi S. et al., *Genet Med.*, 2016).

2.SCOPO DELLA TESI

2.1 PROGETTO 1

Da quanto sinora affermato emerge come la LLC rappresenti una patologia insidiosa dal punto di vista prognostico e altamente eterogenea dal punto di vista clinico, morfologico, immunofenotipico e biologico.

Gli studi di *genome wide* e NGS hanno dimostrato che la LLC è caratterizzata da un genoma solo relativamente stabile. Difatti, oltre alle quattro anomalie con rilevanza prognostica scrinate routinariamente nei laboratori di tutto il mondo, è ormai noto che la LLC è caratterizzata da lesioni citogenetiche addizionali che spesso sono parte integrante di cariotipi complessi. Soprattutto negli ultimi anni il ruolo prognostico del cariotipo complesso sta assumendo sempre maggiore importanza.

Alla luce di tali premesse, l'attuale approccio diagnostico considerato come il *gold standard* per predire il decorso clinico dei pazienti con LLC basato esclusivamente sull'analisi in FISH potrebbe sottostimare la complessità genomica dei pazienti. L'avvento di promettenti metodiche di cariotipizzazione molecolare basate su tecnologia NGS e le consolidate metodiche di microarray e SNP array potrebbero superare le limitazioni della FISH e garantire un'analisi più accurata. Pertanto, lo scopo del primo progetto è stato quello di valutare l'utilità clinica di tre metodiche di citogenetica molecolare, ovvero Multiplex Ligation Probe Amplification, Cytosure Haematological array +SNP array (8x60k) ed una nuova tecnica di cariotipizzazione molecolare basata sulla tecnologia NGS, confrontando il tasso di anomalie rilevate da tali metodiche rispetto a quello individuato dagli attuali approcci diagnostici. Sono stati valutati i punti di forza e gli eventuali svantaggi di ciascuna metodica. Tale lavoro è stato eseguito in collaborazione con il centro di Genetica Umana dell'Università di Leuven (BE).

Lo scopo ultimo è quello di riuscire ad individuare un approccio metodologico vantaggioso che possa essere integrato nella pratica clinica sostituendo o complementando l'analisi eseguita mediante i metodi convenzionali. Riuscire a definire l'intero pannello di anomalie genetiche potrebbe non solo fare luce sui meccanismi patogenetici della LLC ma, potrebbe anche essere d'aiuto ai clinici per una più precisa stratificazione prognostica e, di conseguenza, una migliore definizione del disegno terapeutico più opportuno da intraprendere.

2.2 PROGETTO 2

L'estrema eterogeneità clinica e biologica della LLC rende particolarmente difficoltoso individuare marcatori prognostici che possano stratificare i pazienti in modo accurato. Ad oggi, alla luce del grande armamentario terapeutico disponibile, che si avvale non solo delle diverse combinazioni di chemio-immunoterapia, ma anche di nuovi farmaci aventi come bersaglio i meccanismi patogenetici della malattia, è di fondamentale importanza definire alla diagnosi il rischio di progressione di ogni singolo paziente, con il fine di programmare la strategia terapeutica più adeguata. Nonostante il gran numero di markers biologici attualmente proposti, le anomalie citogenetiche rimangono i più potenti e validati indicatori prognostici, routinariamente scrinati, la cui individuazione rappresenta tuttora il *gold standard* e la base per la classificazione gerarchica convenzionale. Tuttavia nell'algoritmo prognostico convenzionale è evidente una disomogeneità, in termini di *outcome* clinico, tra i pazienti di un medesimo gruppo. L'eterogeneità genetica intratumorale (ITH) potrebbe giocare un ruolo cruciale in questo contesto. Difatti, sebbene l'ITH sia una caratteristica tipica della LLC, ancora non è stato approfondito come questo dato possa essere usato per classificare in maniera più accurata i pazienti.

Pertanto il secondo obiettivo del presente lavoro sarà la validazione, in una casistica *reale-life*, del recente modello prognostico proposto da Yi e collaboratori che include, oltre al tipo di aberrazione citogenetica, anche il numero e le dimensioni dei subcloni intratumorali oltreché la co-presenza di più aberrazioni. Tale modello potrebbe conferire un valore aggiuntivo al significato predittivo delle singole alterazioni citogenetiche.

Inoltre è stato anche eseguito uno studio longitudinale mediante FISH attraverso campionamenti sequenziali per valutare le diverse dinamiche evolutive in base all'architettura clonale emersa alla diagnosi ed in base alla pressione esercitata dalla terapia. Riuscire a definire le variazioni dell'architettura clonale durante il decorso della malattia potrebbe fare chiarezza sui meccanismi responsabili di progressione della LLC e soprattutto della mancata risposta ad un trattamento.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

3.1.1 Descrizione dei pazienti: PROGETTO 1

Per il primo scopo di tale lavoro sono stati selezionati 10 pazienti (4 nuove diagnosi e 3 *follow up*) a cui è stata posta diagnosi di LLC, in accordo con le linee guida dell'International Workshop Chronic Lymphocytic Leukemia/National Cancer Institute (IW-CLL/NCI) (Hallek M., et al *Blood*, 2008), presso l'Ospedale-Universitario di Leuven (Belgio) tra il Maggio del 2007 ed il Novembre del 2014. I pazienti erano prevalentemente maschi (7/10), con un'età media alla diagnosi di 65 anni (range 55-71 anni). Il TTFT medio, valutato per i sei pazienti per i quali è stato necessario eseguire il trattamento terapeutico era di 30 mesi (range 17-79 mesi). Al tempo dell'ultimo *follow up* (31/01/2018), 4 pazienti erano deceduti. Caratteristiche cliniche più dettagliate sono riportate nella tabella seguente. Per tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato, secondo le normative del comitato etico locale.

Caratteristiche cliniche	
	No. Pazienti
Età media alla DG (range)	63 anni (55-71)
Diagnosi/Follow up	6/4
Maschi/femmine	7/3
IgHV status	5M/4UM
BINET	
A	9
B	1
C	-
TTFT (range)	31 (17-79)
Linfociti 10x10 ⁹ /L	23,42 x 10 ⁹ (4,9-6.9 x 10 ⁹)
Deceduti	4

Tabella 4. Caratteristiche cliniche dei 10 pazienti (*Abbrev.* DG, diagnosi; TTFT, Time To First Treatment; IgHV status: M, mutated, UM, Unmutated).

3.1.2 Descrizione dei pazienti: PROGETTO 2

Per il secondo scopo del presente lavoro, l'analisi citogenetica e citogenetico/molecolare è stata eseguita su una popolazione *real-life* di 105 pazienti, afferenti all'Unità Operativa e CTMO dell'Azienda-Ospedaliero di Parma, tra il 1996 ed il 2018.

La diagnosi di LLC è stata posta in accordo con le linee guida dell'International Workshop Chronic Lymphocytic Leukemia/National Cancer Institute (IW-CLL/NCI) (Hallek M., et al *Blood*, 2008) ed in base ai criteri della classificazione WHO (Swerdlow S.H., et al., *Blood*, 2016). Per ciascun paziente è stato valutato l'immunofenotipo mediante analisi citofluorimetrica, includendo i seguenti anticorpi monoclonali: FMC7, CD43, CD79b, CD25, CD23, CD20, CD5, CD19, CD10, CD38, CD11c, CD22 e immunoglobuline di superficie κ e λ .

Le caratteristiche clinico-biologiche sono riportate nella tabella seguente:

Caratteristiche baseline

Caratteristiche	No. Pazienti (%)
Età media alla DG (anni)	68
Range	34-88
Maschi/femmine rapporto	62/43 1,4:1
Binet A	(62%)
Binet B	(24%)
Binet C	(12%)
Rai 0-1	(54%)
Rai 2-3	(37%)
Rai 4	(8%)
Follow-up medio (mesi)	69
Pazienti trattati	60 (57%)
Pazienti non trattati	45 (43%)
TTFT medio	36
Range	0-242

Tabella 5: Caratteristiche clinico-biologiche dei 105 pazienti (*Abbrev.* DG, diagnosi, TTFT, Time To First Treatment).

Sono stati selezionati pazienti per i quali era disponibile l'analisi citogenetica molecolare alla diagnosi o pre-trattamento. Nel 60% dei casi (63/105) la prima analisi citogenetica, ovvero il *time-point 1* del presente studio, coincideva con la diagnosi clinica. Per il rimanente 40% dei pazienti (42/105) l'analisi citogenetica coincideva con l'inizio del trattamento terapeutico, con un tempo medio calcolato tra la diagnosi clinica ed il *time point 1* di 25 mesi.

Il trattamento terapeutico a cui sono stati sottoposti i pazienti (57%) era piuttosto eterogeneo. Generalmente, la Fludarabina, Bendamustina, Clorambucile, in associazione o meno con Rituximab, rappresentavano lo schema terapeutico *first-line*. Nel 35% (21/60) dei casi, la prima linea di trattamento è stata somministrata subito dopo la diagnosi mentre, nei rimanenti pazienti, dopo un tempo medio di 57 mesi. Il 42% (25/60) dei essi ha richiesto più linee di terapia, con un minimo di 2 ed un massimo di 7 linee. I pazienti non responsivi ad una o più linee (33%) sono stati sottoposti a terapie mirate mediante i "*new targeted drugs*", ovvero Idelalisib, Ibrutinib, Acalaibrutinib e Venetoclax. Il 43% dei pazienti è stato sottoposto a *follow up*

clinico osservazionale, con la strategia “*watch and wait*”. Due pazienti sono stati sottoposti a trapianto allogenico da donatore familiare.

All’ultimo *follow up*, 12 pazienti erano deceduti (11,5%).

Di 52 pazienti è stato possibile eseguire uno studio longitudinale, in quanto erano disponibili prelievi sequenziali, con un minimo di 2 ed un massimo di 6 rivalutazioni citogenetiche per paziente. I *time point* su cui si è basata la seguente analisi erano: T₁ → diagnosi (se non disponibile, direttamente analisi pre-terapia), T₂ → pre-terapia, T₃ → post terapia, T_{4,5, ecc} eventuali *follow up*. Il tempo osservazionale medio, inteso come durata dell’analisi citogenetica, calcolato dal T₁ fino all’ultimo *time-point* disponibile era di 61 mesi con un range da 2 a 201 mesi.

3.2 METODI

3.2.1 Dalla Citogenetica alla Citogenomica

Da quando è stato accertato l’esatto numero dei cromosomi nelle cellule umane, nel 1956, sono stati sviluppati numerosi metodi per identificare le anomalie cromosomiche, ovvero alterazioni nel numero o nella struttura dei cromosomi. Le alterazioni numeriche, anche note come aneuploidie cromosomiche, possono essere distinte in monosomie, quando è presente una sola copia del cromosoma anziché due e poliploidie quando sono presenti più copie di uno stesso cromosoma. I riarrangiamenti strutturali possono essere traslocazioni reciproche o *robertsoniane* (tra cromosomi acrocentrici), ed in base alla perdita o al guadagno di materiale genetico si distinguono in traslocazioni bilanciate, se ciò non avviene, e traslocazioni sbilanciate, in caso contrario, oppure possono essere: delezioni, duplicazioni, inversioni, cromosomi ad anello e cromosomi marcatori.

Per la prima volta nel 1959, con la dimostrazione che la trisomia del cromosoma 21 era responsabile della sindrome di Down, fu dimostrata la relazione tra sbilanciamenti genomici e malattie umane. Successivamente, la scoperta che la traslocazione bilanciata tra il cromosoma 9 ed il 22, responsabile della formazione del cromosoma Philadelphia, determinava l’insorgenza della Leucemia Mieloide Cronica (LMC), ha segnato l’inizio della citogenetica del cancro. Qualche anno dopo, l’invenzione di tecniche di bandeggio dei cromosomi, nel 1970, ha consentito di identificare numerose aberrazioni cromosomiche strutturali associate a malattie umane (Nowakowska B et al., *Med Wieku Rozwoj* 2011).

La citogenetica tradizionale, pur utilissima nell’identificare un gran numero di anomalie cromosomiche, è limitata dal potere di risoluzione del microscopio, per cui la massima risoluzione che si può raggiungere con le tecniche di bandeggio dei cromosomi è di 3-5 Mb (Kolialexi A., et al, *Anticancer Res* 2005). Lo sviluppo della tecnologia di ibridazione fluorescente *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization -FISH) ha rappresentato un avanzamento tecnologico notevole per la citogenetica convenzionale, costituendo un enorme passo in avanti non solo nello *screening* dei riarrangiamenti genomici ma ha anche consentito di

identificare il fenomeno dell'eterogeneità intra tumorale tra le singole cellule cancerose. E' nata così l'era della citogenetica molecolare (Nowakowska B et al., *Med Wieku Rozwoj* 2011).

Grazie alle sue numerose applicazioni la FISH attualmente rappresenta non solo un valido strumento per la ricerca di base, ma è ormai diventata fondamentale per la diagnostica clinica. Tuttavia, negli ultimi anni l'avanzamento tecnologico ha portato all'invenzione di strumentazioni *high-throughput* ad alta sensibilità, come i microarray di DNA e il Next Generation Sequencing (NGS), che rappresentano un ulteriore passo avanti nell'analisi citogenetica, segnando l'inizio dell'era della Citogenomica.

In particolare, l'avvento delle moderne tecnologie di microarray ha anche permesso l'identificazione di piccole varianti strutturali dette *copy numbers variants* (CNVs). Le CNVs possono essere delezioni o duplicazioni che portano ad un cambiamento del numero di copie di una specifica regione cromosomica. Possono avere una dimensione che varia da una kilobase (kb) a diverse megabasi (Mb) e sembrerebbero essere la più grande fonte di variabilità genomica, superando anche la variabilità determinata da variazioni di singole basi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (Lupski J.R. *Env Mol Mutagen.* 2015). Queste varianti strutturali quantitative possono coinvolgere anche molti geni tra loro adiacenti e, sebbene in alcune regioni del genoma non abbiano alcuna conseguenza fenotipica, in altre regioni possono influenzare il dosaggio di un gene, e di conseguenza, possono essere responsabili di malattie genetiche. Si stima che circa il 12% del genoma sia coperto da CNVs e più del 41% di tutte i CNVs identificati coinvolga geni noti. Quando presenti in emizigosi in individui sani, questi sbilanciamenti sono considerati "benigni" ovvero non hanno un grande effetto fenotipico sullo sviluppo umano, ma molte CNVs sono ormai note come causa di malattie umane. Le CNVs possono essere distinte in ereditarie o de novo a seconda che esse siano o meno state trasmesse da almeno uno dei genitori (Lupski J.R. *Env Mol Mutagen.* 2015).

3.2.2 Citogenetica Classica

Il presupposto fondamentale per poter ottenere buoni risultati da un'analisi di citogenetica classica è quello di avere a disposizione delle ottime metafasi, ovvero la fase della mitosi in cui per la superspiralizzazione della cromatina, i cromosomi sono altamente condensati e appaiono come strutture subcellulari che possono essere osservati al microscopio ottico. Inoltre, affinché sia possibile procedere con l'analisi citogenetica è necessario che la vitalità delle cellule non sia compromessa.

Tappe della metodica

Dal sangue periferico dei pazienti e dai successivi controlli è stata allestita una coltura a breve termine (48h). In sterilità, sono stati aggiunti 750 μ l ($\sim 5 \times 10^6$ cellule) di campione in una fiaschetta da 25 cm^2 con 8 ml di terreno RPMI (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA), supplementato al 20% con FBS (Fetal Bovin Serum) e all'1% con glutammina ed antibiotico. Per stimolare la proliferazione dei linfociti B sono

stati usati due tipi di mitogeni. Nei prelievi antecedenti al 2015, sono stati aggiunti 200 µl di lipopolisaccaride di *E. Coli* (LPS) e 200 µl di 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA); le colture sono state incubate per 48 h. Per i prelievi eseguiti dal 2016, è stato utilizzato un nuovo kit di mitogeni, “ChromoLympho-B Proliferation Mix” (EuroClone S.p.A), contenente il CpG-oligodeossinucleotide DSP30 e Interleuchina-2, che ha notevolmente migliorato il tasso proliferativo, la quantità e la qualità delle metafasi nei campioni analizzati. Al kit è stato aggiunto 200 µl di TPA, per ciascun campione. Il tempo di coltura previsto dall’utilizzo di questi fattori è 72 h (Davidis MS et al., *Br J Haematol* 2015).

Dopo la coltura le fiaschette sono state incubate a 37° C + 5% CO₂.

Dopo l’incubazione, un’ora prima della fase di processamento dei campioni, sono stati aggiunti 50 µl di colchicina (Colcemid, Invitrogen), al fine di arrestare le cellule in divisione nello stadio della metafase. Il “processamento” è costituito da due fasi:

- il *trattamento ipotonico*, ovvero l’incubazione delle cellule con una soluzione ipotonica di cloruro di potassio (KCl 0.075M) che, avendo una concentrazione salina inferiore a quella della cellula, richiama acqua all’interno della cellula stessa generando una forte pressione sulla membrana, mettendola in tensione. Questa pressione esercitata dall’acqua assunta sulla membrana gioca un ruolo determinante sullo “*spreading*” dei cromosomi durante l’evaporazione finale del fissativo.
- la *fissazione*. Dopo il trattamento ipotonico, le cellule sono state fissate in una soluzione di metanolo ed acido acetico glaciale (fissativo di Carnoy) in rapporto 3:1. L’ elevata quantità di alcol rispetto all’ acido acetico impedisce a quest’ ultimo di entrare in contatto con le molecole di acqua dell’umidità atmosferica. Infatti, in assenza di alcol l’umidità atmosferica è sufficiente ad innescare l’azione dell’acido acetico che in presenza anche solo di poche molecole d’acqua attacca le proteine ed i lipidi delle membrane cellulari distruggendole. L’alcol serve essenzialmente a proteggere le membrane cellulari delle cellule dall’aggressione dell’acido acetico.

Alla fase di fissazione è seguito l’“allestimento dei preparati”, facendo sgocciolare il *pellet* cellulare in fissativo su vetrini istologici che successivamente vengono posti ad essiccare: prima evapora l’alcol che alla fine non è più in grado di impedire all’acido acetico di entrare in contatto con l’acqua presente nell’umidità atmosferica. Tale contatto innesca l’azione dell’acido acetico che attacca le membrane cellulari, degradandole. A questo punto la pressione dell’acqua interna, assorbita durante il trattamento ipotonico, non più trattenuta dalla resistenza della membrana cellulare, provoca un’espansione improvvisa della cellula. In questa fase l’energia liberata trascina con sé anche i cromosomi stirandoli (i cromosomi sono molto elastici), allungandoli e sparpagliandoli (“*spreading*”). Quando tutto l’acido acetico evapora i cromosomi restano fissati sul vetrino.

Una volta pronti i vetrini, si procede con il “bandeggio cromosomico”, che consiste nella colorazione del preparato, risultante nella formazione di un pattern di bande caratteristico per ogni coppia di cromosomi

omologhi, che vengono perciò riconosciuti ed appaiati. Per il primo scopo di questo studio è stato utilizzato il bandeggio R (reverse). Questo tipo di bandeggio prevede una fase di pre-trattamento termico a 92 °C per 20 minuti e successiva colorazione con Acridina Orange per 20 minuti. Le bande ottenute sono opposte alle bande Q.

Per il secondo scopo, è stato, invece, usato il bandeggio Q, che prevede l'utilizzo di un colorante fluorescente, la mostarda di chinacrina (Quinacrine) ed il suo analogo di-idrocloridrato, che si legano direttamente al DNA intercalandosi tra le coppie di basi (si lega prevalentemente ad AT). I vetrini sono lasciati in colorante per 30 minuti e poi vengono immediatamente osservati al microscopio, distinguendo bande Q luminose (bande Q) e bande Q scure (Q negative).

Alla fase di colorazione dei vetrini è seguita “l’osservazione microscopica e la cariotipizzazione”. Quando possibile sono state analizzate almeno 20 metafasi. L’acquisizione delle immagini digitali e l’analisi è stata eseguita mediante IKAROS karyotyping system v3.9.7 (Metasystems, Altusheim, Germany) e mediante Geikon karyotyping system (Nikon Instruments). I cariotipi sono stati descritti, secondo le linee guida ISCN 2016 (Shaffer LG. et al., International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2016).

3.2.3 Citogenetica molecolare

❖ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

I principali limiti della citogenetica convenzionale sono: la possibile assenza di mitosi nelle cellule da analizzare, l’assenza di mitosi nel compartimento cellulare neoplastico, la cattiva morfologia cromosomica, che spesso rende difficoltoso il riconoscimento dei cromosomi ed ancor di più delle loro alterazioni strutturali, e il suo basso potere risolutivo.

La FISH consente di superare tali limitazioni, sfruttando la capacità che hanno le molecole di DNA a singolo filamento ad ibridizzare, in condizioni idonee, con un filamento ad esso complementare. Il principio di tale metodica si basa, infatti, nell’utilizzo di specifiche sequenze di DNA a singolo filamento, dette “sonde”, che possono essere o marcate con sostanze fluorescenti (fluorocromi), oppure legate in modo covalente a biotina o a digossigenina. Tali sonde, essendo complementari ad una specifica regione cromosomica d’interesse, possono ibridarsi alla regione *target*, in cellule fissate sul vetrino. In base al tipo di sonda utilizzata, l’appaiamento (“*annealing*”) tra test probe e sequenza bersaglio, viene dimostrato o direttamente dall’emissione di un segnale fluorescente, in caso di una sonda marcata con un fluorocromo, oppure dal legame del fluorocromo a streptavidina o ad anticorpi antidigossigenina che hanno un’alta affinità per le probe. L’analisi mediante microscopio a fluorescenza consentirà di rilevare il segnale fluorescente.

Un ovvio vantaggio dell’analisi FISH è quello di poter identificare specifiche regioni cromosomiche mediante ibridazione di nuclei interfasicci (FISH interfascica), evitando la fase di coltura cellulare per ovviare

al problema dell'assenza di mitosi. La FISH metafasica ha, invece, il grande vantaggio nella risoluzione di cariotipi complessi e nei pazienti con metafasi di cattiva qualità può identificare le anomalie cromosomiche, specie se queste coinvolgono regioni poco colorate con le più comuni tecniche di bandeggio (Kolialexi A., et al, *Anticancer Res* 2005).

Esistono un numero vario di sonde differenti che si adattano ai diversi scopi e ai diversi esami; si possono distinguere: Sonde centromeriche o alfoidi (CEP - Chromosome Enumeration Probes): ibridizzano le sequenze ripetitive alfa e beta satelliti presenti nei centromeri, utili per identificare specifici cromosomi e per valutare le loro alterazioni numeriche; Sonde locus-specifiche (LSI - Locus Specific Identifier): ibridizzano sequenze specifiche di un gene. L'efficienza di ibridazione dipende dalle dimensioni del DNA bersaglio, più questo è lungo migliore è l'efficienza di ibridazione. Queste sonde sono contenute in vari vettori (YAC, PAC, BAC). In onco-ematologia, fornendo segnali ben evidenti, sia in metafase che in interfase, consentono di eseguire un rapido *screening* delle varie traslocazioni, delezioni cromosomiche o amplificazioni geniche. In commercio sono disponibili vari tipi di sonde *locus* specifiche a seconda del tipo di aberrazione genica: per la ricerca di specifiche traslocazioni ci sono le sonde "dual color - dual fusion" che consentono di identificare il gene di fusione specifico, ma anche il reciproco, con un doppio segnale di fusione (es. BCR-ABL, PML-RARA). Ci sono, inoltre, le sonde "dual color break-apart" che sono utilizzate per identificare i riarrangiamenti dei cosiddetti "geni promiscui", ovvero quei geni, come *MLL* o il *locus IgH* o il *locus* del *TCR* (recettore dei linfociti T), che hanno molti *partner* differenti di traslocazione. Utilizzando queste sonde la presenza del riarrangiamento del gene è identificata tramite lo split del segnale, anziché il segnale di fusione; sonde telomeriche: sono utili nell'identificazione di traslocazioni che coinvolgono le regioni telomeriche; sonde painting (WCP, Whole Chromosome Painting): sono una miscela di sequenze di DNA ottenute da cromosomi separati o da librerie genomiche, che colorano l'intero cromosoma. L'uso di queste sonde è riservato all'ibridizzazione di cromosomi metafasici, di cui permette di studiarne la struttura, facilitando la risoluzione di traslocazioni complesse.

Dunque, la citogenetica molecolare presenta notevoli vantaggi: consente di mappare i punti di rottura delle varie traslocazioni cromosomiche, è una metodica semplice, con elevata sensibilità e specificità che consente di esaminare un elevato numero di cellule in tempi brevi, non necessita che la cellula in studio sia in mitosi (FISH interfase), può definire l'origine e la natura di cromosomi marcatori e di cariotipi complessi (FISH metafase), può rilevare riarrangiamenti cromosomici criptici, al di sotto della risoluzione citogenetica o di identificare traslocazioni di difficile individuazione da parte del citogenetista, come la t(11;19), la t(15;17) e l'inv(16), in preparati sub-ottimali e consente di valutare la risposta ad una terapia svelando l'eventuale malattia minima residua (MMR).

Sonde utilizzate nel presente lavoro

Per l'analisi in FISH dei campioni sono stati utilizzati kit commerciali atti ad identificare le quattro anomalie maggiormente ricorrenti nei pazienti con LLC [del(13q), trisomia 12, del(11q23)(*ATM*) e del(17p)(p53)]. Tali Kit consentono l'analisi contemporanea di due *locus* genici bersaglio, marcati con due differenti fluorocromi:

1. XL ATM/TP53 (Metasystems, Altusheim, Germany).

Sonda locus-specifica che rivela delezioni nel braccio lungo del cromosoma 11 e nel braccio corto del cromosoma 17. La sonda marcata con fluorocromo Spectrum Green ibrida sul cromosoma 11, nella regione 11q22, includendo il gene *ATM*. La sonda marcata con il fluorocromo Spectrum Orange ibrida sul gene *TP53* e sulle regioni fiancheggianti 17p13 (Fig. 11).

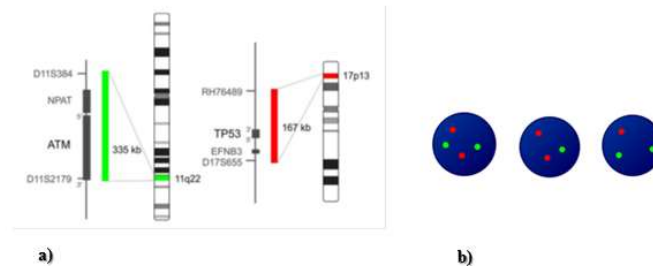


Figura 11: (a) Ideogramma del cromosoma 11 e 17 che mostrano le regioni geniche in cui ibridano le sonde testate. (b) possibili pattern di ibridizzazione, da sinistra: cellula normale (2G2O), cellula anomala con delezione di *ATM* (1G2O), cellula anomala con delezione di *TP53* (2G1O).

2. Il “set probe” XL DLEU/LAMP/12cen (Metasystems, Altusheim, Germany).

Un mix di sonde di tre colori che ibridizzano (Fig. 12):

- a livello 13q14, comprendendo il gene *DLEU1* (incluso il marcatore D13S319) ed i mir15a e mir16-1 emettendo un segnale rosso
- a livello 13q14 includendo il gene *LAMP*, emettendo un segnale blu (acqua)
- sul centromero del cromosoma 12 emettendo un segnale verde.

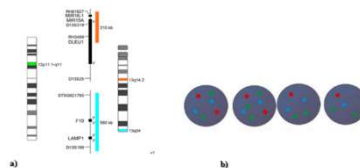


Figura 12: (a) Ideogramma del cromosoma 12 e 13 che mostrano le regioni in cui ibridano le sonde testate. (b) possibili pattern da sinistra: cellula normale (2G2O2B), cellula anomala con trisomia 12 (3G2O2B), cellula anomala con delezione del locus *DLEU* (2G1O2B), cellula anomala con delezione dell'intero locus *DLEU* e *LAMP1* (2G1O1B).

Inoltre, è stata anche testata una sonda per valutare i riarrangiamenti coinvolgenti il cromosoma 14, XL IGH break apart.

3. XL IGH plus break apart (Metasystems, Altusheim, Germany).

Sonda locus-specifica break apart complementare alla regione telomerica del cromosoma 14 (14q32.3), in cui è mappato il gene *IgHV*, marcato in verde. La sonda rivela riarrangiamenti del 14q32 (Fig. 13).

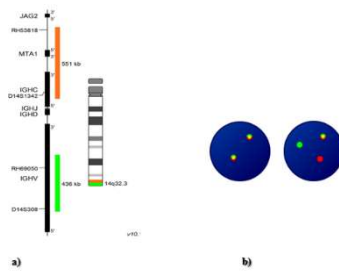


Figura 13 (a) Ideogramma del cromosoma 14 che mostrano le regioni geniche in cui ibridano le sonde testate. **(b)** Possibili pattern da sinistra: cellula normale (2F), cellula anomala che indica riarrangiamenti del gene *IgH* (1F21G10).

Per il primo progetto, è stata usata anche la seguente sonda:

4. Vysis LSI 13 (RB1) 13q14 e LSI D13S319

Consiste in un mix di due probes che ibridizzano a livello della regione 13q14. Una sonda complementare al locus contenente il marker D13S319, marca in rosso (SO), ed una complementare al gene *RBI*, marcata in verde (SG) (Fig. 14).



Figura 14: Sono schematizzare le regioni genomiche interrogate dalle sonde testate.

Per tutte le sonde è stato stabilito un *cut-off* del 5%

Tappe della metodica FISH:

Il preparato, precedentemente fissato e strisciato su vetrino portaoggetti secondo le comuni procedure della citogenetica convenzionale sopra descritte, ha subito i seguenti trattamenti:

- Deidratazione, tramite tre passaggi in una scala crescente di alcol etilico (ETOH 70%-85%-100%) di due minuti ciascuno.
- Applicazione di 10 µl di sonda.
- Denaturazione simultanea (codenaturazione) con calore ($75\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 5 min.) del DNA del campione in esame e della sequenza oligonucleotidica costituente la sonda. I vetrini vengono posti in ibridizzatore, precedentemente riscaldato alla opportuna temperatura di denaturazione.
- Ibridazione in incubatore a 37°C per 12-16 ore, periodo di tempo che consente alla sonda di riconoscere il DNA bersaglio ("annealing") del campione in esame.

Sono disponibili in commercio opportuni sistemi che consentono di combinare codenaturazione e ibridizzazione. In questo studio è stata utilizzata un'apparecchiatura (HIBrite, Vysis) fornita di una piastra che ha la capacità di ospitare più vetrini (sino a 12) e di variare la temperatura consentendo in tempi rapidi il passaggio dalla temperatura di denaturazione a quella di ibridazione. In tal modo viene ridotto il numero di passaggi e di conseguenza il tempo di svolgimento dell'intero processo.

- Alla fase di ibridizzazione, seguono due lavaggi post-ibridazione eseguiti a temperature differenti tramite opportune soluzioni di lavaggio ($0.4\times\text{SSC}/0.3\%\text{NP40}$ a $73\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $2\times\text{SSC}/0.1\%\text{NP-40}$ a T ambiente), per eliminare la sonda in eccesso ed eventuali legami aspecifici.
- Controcolorazione con DAPI (10 uL).
- Esame del preparato al microscopio a fluorescenza e acquisizione delle immagini mediante software GENIKON (Nikon Instruments) e mediante ISIS digital image analysis system V5.4.12 (Metasystems, Altusheim, Germany).

Oltre alle metodiche sopra descritte, per il secondo scopo del mio lavoro di tesi, sono state eseguite le seguenti tecniche di citogenetica molecolare.

❖ Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

La MLPA consiste sostanzialmente in una tecnica di PCR multiplex (amplifica diverse sequenze geniche in un solo esperimento), consentendo di rilevare CNVs in più di 50 sequenze di DNA o RNA contemporaneamente. E' una tecnica molto semplice, economica e non richiede un'attrezzatura troppo elaborata (oltre ad un termociclatore è necessario almeno un sequenziatore per separare su gel o su capillare i frammenti prodotti). Consente di processare contemporaneamente fino a 96 campioni, utilizzando un

quantitativo di DNA iniziale relativamente basso (a partire da 20 ng), e fornendo risultati anche in sole 24 ore.

Tappe della metodica:

L'analisi è stata eseguita su DNA estratto mediante il kit di estrazione del DNA "chemagic DNA Blood" (Chemagen, Baesweiler, Germany). Per ogni campione è stata usata una quantità di DNA di 20 ng/uL. Ogni sonda MLPA consiste di due sequenze oligonucleotidiche separate (Fig. 15), un oligonucleotide di sintesi ed un oligonucleotide derivante dal vettore M13, che possono essere legate insieme da una ligasi solo se ibridizzano in regioni *target* adiacenti. Entrambe le due semi-probes contengono una regione complementare ad uno dei due primer PCR universali (X,Y), utilizzati per la successiva reazione di amplificazione. Solo in una delle 2 sonde (quella derivante dal vettore M13) è contenuta una sequenza aspecifica avente lunghezza diversa per ogni sonda, nota come *stuffer sequence*. La presenza della *stuffer sequence* permette il riconoscimento delle diverse sequenze amplificate in base alla lunghezza dei frammenti marcati, che si produrranno alla fine dell'esperimento. Inoltre, solo uno dei due primers ha una marcatura fluorescente utile per la rilevazione in sequenziatori con tecnologia a gel o a capillare.



Figura 15: Struttura di ogni coppia di sonda MLPA.

Le tappe della metodica possono essere distinte in 5 fasi (Schouten J.P. et al., *Nuclei Acid Research*, 2002):

1. Denaturazione del DNA test a 98 °C per 5 minuti, nel termociclatore.
2. Ibridizzazione del DNA test con le sonde di MLPA *overnight* a 60 °C per un minimo 16h ed un massimo 18h. Le due sonde si ibridizzano in due regioni contigue di una sequenza *target*.
3. Ligazione: Se l'ibridazione ha avuto successo, ossia entrambe le sonde si sono appaiate alle due regione *target* contigue, una ligasi può intervenire e legare chimicamente tra loro le due mezze sonde, formando così un'unica sonda (Fig 16). L'enzima ligasi è inattivato per trattamento termico nei passaggi successivi.



Figura 16: Fase di ligazione.

Per ogni campione è stata aggiunta una mix contenente 1 μ l di ligasi in 32 μ l totali di soluzione. Il programma avviato nel termociclatore consiste di tre fasi: 54 °C per 15 minuti, 98 °C per 5 minuti e 20 °C per il resto dell'esperimento.

Da notare che l'ibridazione e la ligasi permettono in pratica di rendere disponibile, nel mix di reazione successivo, una serie di frammenti dalla lunghezza variabile che hanno in comune le estremità (colorate in nero nella Figura 16) che sono complementari alla stessa coppia di primers universali.

4. Amplificazione. Per ogni campione sono stati aggiunti 10 μ l di una mix contenente: una coppia di primers universali, acqua e l'enzima polimerasi. Sono stati effettuati 35 cicli, per ogni ciclo è stato impostato nel modo seguente: 95°C per 30 secondi, 60 °C per 30 secondi, 72 °C per 20 minuti e 4 °C fino a fine esperimento.

Solo le sonde unite dall'azione della ligasi verranno amplificate, poiché quelle contenenti solo una sequenza primer non potranno essere amplificate esponenzialmente. Le sonde che non sono state legate verranno successivamente eliminate mediante passaggi con soluzioni di lavaggio. Pertanto il numero di *probes* che sono state unite dalla ligasi e successivamente amplificate rappresentano una stima diretta del numero di sequenze *target* presenti.

5. Separazione e quantificazione dei prodotti amplificati mediante elettroforesi capillare. L'ultima fase sperimentale è la separazione dei diversi frammenti amplificati, la cui lunghezza è connessa al sito bersaglio della sonda MLPA. Per ogni probe viene quantificato il segnale emesso dalla marcatura fluorescente di ogni sonda.

In questo lavoro la separazione dei prodotti di PCR è stata eseguita usando il sequenziatore automatico ABI 3730xl Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) che consente di analizzare 96 campioni contemporaneamente. Mediante il software FRAGMENT ANALYSIS, sono stati analizzati i vari frammenti e ad ognuno è stata attribuita una data lunghezza. Per ogni campione, il software calcola l'area totale di tutti i picchi e poi per ogni picco è stata calcolata l'area relativa (area del picco/area totale).

6. Analisi dei dati. L'analisi è stata eseguita mediante il software Coffalyser.Net.v.140721.1958. I dati sono automaticamente normalizzati mediante normalizzazione sia intra- (confronto con le sequenze reference) che inter- campione, determinando un valore finale generato dal confronto tra l'intensità dei segnali fluorescenti emessi dalle sonde amplificate con quelli generati in campioni di controllo. Tale valore è definito Dosage Quotient (DQ). Variazioni del DQ tra 0.7-1.3 indicano presenza di delezioni o duplicazioni. DQ=1 condizione diploide normale, DQ <0.7 = delezione eterozigote e DQ=0 delezione omozigote.

○ Descrizione del kit del “SALSA MLPA P038-A2 CLL” by MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands).

In questo lavoro di tesi è stato usato il kit di sonde “SALSA MLPA P038-A2 CLL” disegnato da MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands). Nel kit sono contenute 51 sonde diverse, ognuna consente di ottenere un prodotto di amplificazione tra 130-50 nucleotidi (Tab. 6). Delle 51 sonde, 38 mappano in regioni diagnostiche *target*, tra cui sia sonde per regioni comunemente testate durante l’analisi FISH dei campioni di LLC (delezioni in 13q, in 17p, 11q e trisomia 12), ma anche sonde per regioni che sono considerate essere coinvolte nella patogenesi della LLC ma non testate comunemente in FISH (10q23, 14q24.1-q32.33 e cromosoma 19). Le restanti 13 sonde sono probes reference (o sonde di controllo) che mappano regioni non coinvolte nella LLC, per le quali ci si aspetta un valore normale in tutti i campioni ed usate per la normalizzazione intracampione. In più sono inclusi nel kit anche 9 frammenti di controllo (control fragment) che generano prodotti di amplificazione più piccoli di 120 nucleotidi. Essi si dividono in:

- Q-fragments di 64, 70, 76, 82 nucleotidi, usati come controllo della quantità di DNA (quantity fragments). Esse sono ligasi-indipendenti ma polimerasi-dipendenti, la loro altezza dovrebbe essere molto minore della metà, salvo nel caso di DNA iniziale troppo scarso.
- D-fragments di 86, 92, 96 nucleotidi per il controllo del DNA denaturato, definiti (D-fragments). Questi consentono di valutare la riuscita dell’esperimento e normalmente hanno un’altezza simile agli altri frammenti.
- frammenti per i cromosomi sessuali X (X-fragment) ed Y (Y-fragment) di 105 e 100 nucleotidi, rispettivamente.

Target	n° probes	Lunghezza media (nt)
10q23.31 (<i>PTEN</i>)	2	420
11q22.3 (<i>ATM</i>)	8	314
Chr.12	5	249
13q14 region	7	159
14q32.33	3	265
17p13 (<i>TP53</i>)	5	260
Chr.19	3	342
Control probes	13	---

Tabella 6: Sono riportate le sonde e la loro lunghezza media, P038-A2 CLL usato.

Inoltre, in ogni esperimento sono stati inclusi 3 donatori sani come controllo (reference sample), in cui le sonde reference e target devono mostrare un normale numero di copie. In aggiunta, in ogni esperimento è stato anche incluso un campione di controllo positivo, con un differente numero di copie per le probes target.

Nel probe kit è incluso anche un controllo in cui il DNA è sostituito con acqua o con TE buffer (NO DNA control) per valutare la contaminazione dei reagenti.

E' importante sottolineare che sebbene i vantaggi sopra elencanti la MLPA mostra anche notevole svantaggi. Innanzitutto, vari fattori legati alla metodica possono rendere, molto spesso, l'interpretazione dei risultati poco chiara. La maggior fonte di incertezza è legata ad una possibile degradazione o a poca purezza del DNA. Inoltre, i kit MLPA, non essendo ancora certificati, non possono essere utilizzati come prova ufficiale nella diagnostica medica. Generalmente, la metodica è utile per uno *screening* veloce ma richiede la conferma mediante altri approcci sperimentali più mirati e precisi. Infine, risulta una tecnica poco sensibile, difatti se la percentuale delle cellule tumorali è inferiore al 30-40% i risultati possono essere non affidabili.

❖ **Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) + SNP arrays**

E' ormai ampiamente dimostrato che gli aCGH hanno rivoluzionato la citogenetica classica, rappresentando il primo valido strumento per rilevare nell'intero genoma sbilanciamenti cromosomici (Pinkel et al., *Nature Genetics*, 2005). Rispetto alla FISH presentano una risoluzione molto più alta e soprattutto consentono di rilevare contemporaneamente CNV che coinvolgono *loci* diversi del genoma, in un solo esperimento. In poche parole, gli aCGH possono essere considerati come un esperimento FISH che testa contemporaneamente più sonde insieme.

I principali vantaggi di tale tecnica sono, l'alta risoluzione, non richiede colture cellulari ed evita la soggettiva interpretazione dei segnali di fluorescenza rilevati dall'analisi FISH (Hagenkord J.M et al., *J Mol Diagn.* 2010). Un altro importante vantaggio è la possibilità di definire, mediante tale metodica, la dimensione della delezione, che per alcune patologie rappresenta un importante ruolo prognostico. Il caso della del(13q) nella LLC è un ottimo esempio (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014). Inoltre con gli aCGH è possibile anche rilevare il fenomeno della cromotripsia, fenomeno individuato nel 2-3% di tutte le neoplasie e associato ad un *outcome* sfavorevole (Puiggros et al., *Biomed Res Int* 2014).

Il mancato riscontro di traslocazioni bilanciate, la riduzione della *performance* in caso di basso carico tumorale (<20-30% di cellule anomale) e l'impossibilità di definire l'architettura clonale ne rappresentano, invece, i limiti (Shouman J. et al., *Gene Chrom. Cancer*. 2016).

Sebbene, da ormai più di 10 anni, tale metodica è ampiamente utilizzata nella citogenetica costituzionale (soprattutto per la diagnosi di ritardo mentale), non ha ancora preso piede nella routine clinica

oncoematologia. Nonostante ciò, negli ultimi anni l'analisi mediante arrays è stata introdotta, in alcuni laboratori, nel *setting* diagnostico per alcune specifiche neoplasie solide ed ematologiche, ossia quelle neoplasie caratterizzate prevalentemente da sbilanciamenti (Shouman J. et al., *Gene Chrom. Cancer*. 2016). Ad oggi, non sono stati ancora definiti criteri standard per l'interpretazione dei risultati ottenuti e soprattutto ci si sta interrogando se, ai fini diagnostici della *routine* oncoematologica, è realmente utile avere informazioni così specifiche (es. CNAs focali <5MB) dell'intero genoma (Shouman J. et al., *Gene Chrom. Cancer*. 2016). Nonostante tale premessa, è però opportuno considerare che l'individuazione di nuovi marker molecolari e di strategie di *targeted therapy* sottolinea l'importanza di introdurre tecniche molecolari ad alta risoluzione anche nella pratica clinica (Shouman J. et al., *Gene Chrom. Cancer*. 2016). L'uso degli aCGH potrebbe essere particolarmente utile in quelle neoplasie come LLC ed il Mieloma Multiplo (MM), perché le alterazioni genetiche di rilevanza clinica sono rappresentate da sbilanciamenti (gain e loss, ovvero amplificazioni e delezioni) piuttosto che traslocazioni bilanciate o inversioni, non individuabili con tale metodica.

Lo studio del cariotipo con "microarray" può essere eseguito con diverse piattaforme. Gli "array" possono essere "genome-wide" (sonde distribuite lungo l'intero genoma) o "targeted" (sonde per specifiche regioni del genoma) (Hagenkord J.M et al., *J Mol Diagn*. 2010). Inoltre è possibile distinguere le varie piattaforme in base al tipo di sonde e quindi al diverso grado di risoluzione; le sonde possono essere:

- cromosomi artificiali batterici (BAC), con una risoluzione di 150-160 Kb (BAC-arrays)
- oligonucleotidi di 10-100 bp, (oligo-arrays)
- sonde di oligonucleotidi contenenti polimorfismi (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), definiti SNP-arrays con una risoluzione di 21-25 bp.

La risoluzione dipende dal numero di sonde utilizzate, dalla loro lunghezza e dalla distanza l'una dall'altra. Maggiore è il numero di *probes* consecutive per una data regione cromosomica e più alto è il *coverage* dunque maggiore sarà l'affidabilità del risultato (Pinkel et al., *Nature Genetics* 2005). A prescindere dal tipo di piattaforma utilizzato, il principio su cui si basano tutti gli aCGH è lo stesso: viene valutata la variazione nel numero di copie di ciascuna regione cromosomica, confrontando il valore d'intensità fluorescente tra il DNA in esame *versus* un DNA reference, colorati con fluorocromi diversi. Il risultato finale viene fornito come \log_2 ratio.

Per quanto riguarda gli SNP arrays, un vantaggio importante è quello di valutare lo stato di eterozigosi di una data regione cromosomica e quindi l'eventuale perdita di eterozigosi (LOH) (Hagenkord J.M et al. *J Mol Diagn*, 2010). Dato che vengono inclusi SNPs con un tasso di eterozigosi >30%, ampie regioni di omozigosi (AA o BB) possono indicare, con notevole affidabilità, la LOH (Hagenkord J.M et al. *J Mol Diagn*, 2010).

Tappe della metodica

Per lo studio in esame è stata usata la piattaforma “CytoSure Haematological Cancer + SNP Array (8x60k) platform”, sviluppata da Oxford Gene Technology (OGT) (Begbroke, Oxford,UK). Ogni vetrino da microarrays contiene 8 chamber con 60.000 probes. E’ una piattaforma ad alta risoluzione, con un *coverage* di 68 kb per cromosoma e di 117 kb per l’intero genoma, con una risoluzione di 30 Mb per SNPs. Il vantaggio principale della piattaforma utilizzata consiste nel valutare in un unico esperimento sia CNVs sia SNPs, in quanto le *probes* usate sono oligonucleotidi contenenti SNPs. Ciò consente un’accurata identificazione di LOH, anche senza una contemporanea variazione nel numero di copie, ovvero copy-neutral LOH. Questo tipo di sonde possono discriminare gli SNPs mentre lavorano sotto condizioni di ibridizzazione sviluppate per la rilevazione dei CNV. In tale piattaforma per ogni SNPs sono state disegnate due sonde così che quando è presente uno SNP in omozigosi solo una delle due sonde è ibridizzata (Fig.17)

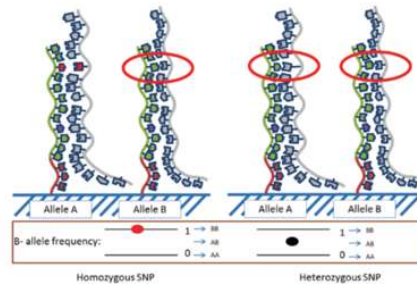


Figura 17. Il principio delle “SNP calling”. Se uno SNP è presente in eterozigosi, entrambe le probes si ibridizzano, e nel BAF plot ciò è mostrato con uno score di 0.5 mentre, se ci sono SNP in omozigosi solo una delle due probes si ibridizzerà e ciò viene mostrato nel BAF con uno score di 1 o 0. La comparazione dell’intensità dei segnali delle due probes consente di discriminare tra SNPs in omozigosi eterozigosi.

Per ogni campione è stato eseguito una reazione di colorazione incrociata (dye swap duplicate reactions), ovvero in un primo esperimento il DNA test è stato colorato con un il clorante fluorescente Cy3 ed il DNA reference con il colorante fluorescente Cy5, mentre in un secondo esperimento, i due campioni sono stati colorati in modo opposto. Il fine è quello di un doppio controllo nella fase di analisi dati. Il DNA reference è stato raccolto da donatori volontari sani (maschi e femmine).

Si è proceduto innanzitutto con l’estrazione del DNA dal sangue midollare o periferico dei pazienti mediante kit di estrazione QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (Qiagen Hilden, Germany). La concentrazione ottimale di DNA era di 500 ng. I campioni sono stati denaturati in un termociclatore a 98 °C per 20 minuti, per ottenere singoli filamenti di DNA. Successivamente si è proceduto seguendo le raccomandazioni del protocollo fornito da OGT. La tecnica consiste in 5 steps:

- 1) **Marcatura del DNA:** il DNA tumorale test ed il DNA reference sono stati colorati con differenti fluorocromi. Il DNA test è generalmente colorato con il colorante Cy3 che appare rosso sotto la normale luce e verde (575 nm) sotto eccitazione mediata da laser. Ai campioni sono stati aggiunti 6 µl di una mix, costituita da dNTPs (deossinucleoside trifosfato), uno dei due coloranti, e l’enzima EXO-KLENOW

FRAGMENT, ed incubati a 37 °C per 2h e a 65°C per 10 minuti, in cui viene denaturato e bloccato l'enzima (Fig. 18).



Figura 18. Marcatura del DNA test e DNA reference e mix dei campioni un unico tubo.

Dopo le due ore, il DNA sample ed il DNA reference sono stati mischiati insieme in un'unica eppendorf. Si è proceduto con una serie di lavaggi per eliminare il colorante non incorporato ai campioni. Successivamente, è stata aggiunta una nuova mix, contenente 1.0 mg/ml di COT-1 DNA e 4,5 µl di Agilent Blocking Buffer, che evita che l'ibridizzazione aspecifica delle sequenze altamente ripetute all'arrays. I campioni sono stati posti in un bagnetto a 95 °C per 10 minuti per consentire una nuova denaturazione del DNA, ed infine sono stati incubati a 37°C per 30 minuti.

- 2) Allestimento dei vetrini:** 10 µl del mix DNA test ed il DNA reference sono stati depositati nelle 8 chamber dei vetrini. Ogni chamber contiene tanti piccoli spot, in ognuno di essi sono presenti sequenze di oligonucleotidi complementari ad una regione specifica del genoma (sonde) (Fig. 19).

I vetrini sono incubati in rotazione a velocità di 20 rpm per almeno 16 ore ad una temperatura di 65 °C.

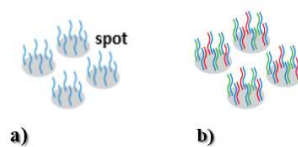


Figura 19. (a) spot che contengono le sonde specifiche per una data regione genica. (b) ibridizzazione competitiva.

- 3) Ibridizzazione competitiva.** Durante questa fase il DNA test ed il DNA reference competono per il legame alle sonde. Sulla base del loro genotipo, i frammenti si legano in modo specifico alle sonde complementari, adese al vetrino. E' ovvio che se c'è un'amplificazione in una regione del DNA test, la quantità di DNA che si legherà alle *probes* complementari sarà molto maggiore rispetto al DNA reference.

Prima della successiva fase, i campioni sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi: 5 minuti nel washing buffer I a temperatura ambiente e 1 minuto nel washing buffer II a 37°C.

4) Scansione dei Microarrays: Il segnale fluorescente determinato dai frammenti ibridati viene rilevato da uno scanner (Agilent DNA Microarray Scanner v.A.8.5.1, Santa Clara, CA, USA). L'estrazione delle immagini è stato eseguita mediante Feature Extraction software (Agilent Technologies).

Ogni campione quando scannerizzato emette un'intensità di fluorescenza diversa. Per ogni spot viene quantificata la quantità di campione rispetto al DNA reference per una specifica regione genomica.

I valori di intensità rilevati vengono normalizzati ad un valore di copie diploide, ovvero il valore normale degli alleli sui cromosomi somatici. Di conseguenza una delezione in omozigosi risulterà in un valore di CNV pari a 0, mentre una delezione in eterozigosi avrà un valore di 1. Le amplificazioni (o *gain*) saranno infine identificate da valori di CNV pari a 3 o superiori.

5) Analisi dei dati. I dati sono stati analizzati mediante, CytoSure Interpret software v4.3 (OGT), che usa l'algoritmo Circular Binary Segmentation (CBS), mediante il quale vengono confrontati i segnali di intensità prodotti dal DNA reference e DNA test. Il risultato finale viene fornito come \log_2 ratio.

In sostanza, il rapporto tra le intensità di fluorescenza rilevate dallo scanner è direttamente proporzionale al rapporto tra il numero di copie di DNA test e del DNA reference. Se il rapporto tra i due è uguale a 1 significa che per entrambi sono presenti due copie alliliche [$\log_2 2/2 = 1$], dunque la regione analizzata non presenta alterazioni. Se il rapporto tra i due fluorocromi è alterato, maggiore o minore di 1, significa che è presente o una delezione o un'amplificazione. Nello specifico, il $\log_2 (3/2) = 0.58$, ovvero 3 copie del DNA test e 2 del DNA reference, è indice di amplificazioni eterozigote; $\log_2 (1/2) = -1$, ovvero 1 copia del DNA test e due copie del DNA reference, è indice di delezione eterozigote.

Nel presente lavoro i valori di *cut-off* per definire regioni di delezioni era: $\log_2 -0.36$; il valore di cut off per definire amplificazioni era: $\log_2 +0.36$. In particolare sono stati considerati solo i valori di \log_2 genarti da almeno 4 sonde per ogni segmento genico considerato. Per escludere la presenza di falsi positivi o artefatti, tutte le alterazioni fornite dai software, sono state ricontrollate visivamente.

Per definire regioni di LHO, è stato considerato lo score standard usato dal software: "LHO score" (= valore di 150). Il software provvede a definire la % di omozigosi ed eterozigosi per ogni SNPs. Si riteneva una "call" di omozigosi reale solo se presenti 60% di SNPs in omozigosi.

Inoltre, per discriminare tra SNPs in omozigosi ed eterozigosi, il software usa dei propri parametri di default:

- LOWER BOUND: SNPs il cui valore di intensità di segnale era < 0.45 erano definiti SNPs in eterozigosi
- UPPER BOUND: SNPs il cui valore di intensità era > 0.5 erano definiti SNPs in omozigosi.

Gli SNPs il cui valore assoluto di intensità cadeva tra questi due valori soglia, sono stati esclusi dall'analisi.

Dalla comparazione dell'intensità del segnale tra il DNA test vs il DNA reference, oltre al \log_2 viene generata un'altra matrice, ovvero la frequenza dell'allele B [B allele frequency (BAF)]. Il BAF fornisce

informazioni sul genotipo e può essere usato per assegnare accuratamente il numero di copie nelle regioni diploidi del genoma da 0 a 4, per cui BAF di 1 o 0 indicano la completa assenza di uno dei due alleli (AA, BB), mentre BAF di 0.5 indica eguale presenza dei due alleli (AB).

Per lo scopo di questo lavoro, l'interpretazione dei dati ottenuti è stata eseguita basandosi sulle linee guida proposte da Schoumans et al., 2016. In accordo con queste linee guida:

- solo regioni > di 5 Mb, indipendentemente dai geni inclusi, venivano considerati risultati positivi
- CNAs focali (<5Mb) erano considerati solo se coinvolgevano geni ben noti correlati con la patogenesi della LLC.
- regioni di CN-LHO sono state considerate reali se erano > di 10 Mb e se si estendevano ai telomeri e/o in mosaicismo. Regioni con 4 genotipi (AAA, AAB, ABB, BBB), sulla base delle BAF erano considerati in mosaicismo mentre regioni con genotipo AA o BB erano considerati LOH puri (non in mosaicismo).
- CNAs focali nei geni delle Ig (*IgH*, *IgL-k*, *IgL-l*), sono stati esclusi dall'analisi.

Tutte le coordinate genomiche sono state descritte in accordo al NCBI human genome build 37 (hg19, February 2009) ed i risultati sono stati descritti secondo le linee guida ISCN 2016 (Shaffer LG et al, 2016 ISCN).

In fine, il software CytoSure fornisce anche un proprio controllo di qualità, confrontando il rumore di sottofondo (“noise”) prodotto dalle *probes*, generando un valore definito “Derivative Log Ratio (DLR) Spread”. Valori di DLR > 0.20 sono stati considerati indice di scarsa qualità. Per ogni campione si è proceduto al controllo dei valori di DLR.

❖ Next Generation Sequencing per l'analisi dei CNVs: Low Pass Sequencing

I CNVs, per più di 20 anni sono stati rilevati prima dagli aCGH e successivamente da piattaforme di micro arrays e SNP arrays. Oggi, le tecniche di sequenziamento dell'intero genoma (whole-genome sequencing, WGS), rappresentano un'alternativa ai microarrays in diverse applicazioni di analisi genomiche, incluso l'analisi dei CNVs. Sono stati proposti diversi metodi per valutare i CNVs mediante tecniche di sequenziamento, ognuno con i propri vantaggi e svantaggi. Nessuno di questi metodi ad oggi è stato pienamente validato.

In questo lavoro di tesi è stata usata una nuova tecnica di cariotipizzazione molecolare a basso *coverage* (0.17x con 12×10^6 reads per campione), basata sulla tecnologia NGS (Illumina), per l'identificazione di CNVs: Low Pass Sequencing. Il DNA da campioni di sangue intero è stato estratto mediante il kit chemagic DNA blood4K (Chemagen, Baesweiler, Germany). La concentrazione e la purezza del DNA sono stati misurati mediante DropSense96 (Trinean NV/SA Gentbrugge, Belgium).

La metodica, piuttosto complicata, si basa sulla tecnologia Illumina e si compone di 4 fasi fondamentali:

- 1) Preparazione della sequencing library (5 ore):** 500 ng di DNA sono stati frammentati in piccoli segmenti (200-300 bp) mediante sonicazione usando Covaris M220 (Covaris Inc, Woburn, MA). Essi rappresentano lo stampo per la sintesi di numerosi frammenti complementari, detti **reads**.

Ogni piccolo frammento di DNA originario viene quindi copiato molte volte, in un numero variabile di reads. A seconda del livello di precisione desiderato è possibile settare il sistema per ottenere un certo livello di *coverage*¹, ossia un certo numero di reads. Ad esempio 100 reads per frammento, (coverage 100x) è già sufficiente per la diagnostica di routine delle malattie mendeliane, invece per la diagnostica di mutazioni somatiche, tipiche dei tumori, può essere necessario un *coverage* di 500x.

Per la preparazione della library è stato usato il KAPA HTP Library Preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). In questa fase a ciascun frammento viene legato una sequenza nucleotidica detta adattatore P5 e P7 (adaptors), che servirà per ancorare i frammenti di DNA al supporto sul quale avverrà la reazione di sequenziamento (flow cell). Inoltre, gli adattatori sono legati a delle sequenze index (o sequenze barcode), ciascuna diversa per ogni pazienti, consentendo così di eseguire il sequenziamento in parallelo di più campioni contemporaneamente (possono essere sequenziati in un unico esperimento fino a 15 campioni). Ad ogni adattatore è anche legato una sequenza *primer* per il sequenziamento (Rd1 SP e Rd2 SP, SP = sequencing primer).

Per consentire l'aggiunta degli adattatori avviene una reazione di end-repair e di "A-tailing". La frammentazione crea dei frammenti di DNA con estremità sporgenti (overhang), pertanto durante tale fase viene sintetizzato il filamento sottostante mancante, creando estremità piatte o blunt, e viene aggiunta una singola adenina all'estremità 3' (reazione di A-tailing). Poiché la corrispondente timina è presente all'estremità -3' dell'adattatore, ciò permette la formazione di due legami ad idrogeno tra le due basi complementari ed il conseguente legame (Fig. 20).

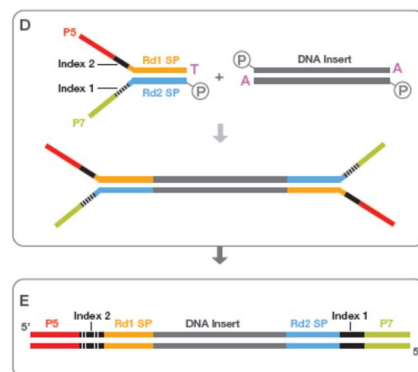


Figura 20. Rappresentazione schematica delle read dopo l'aggiunta delle sequenze adattatore (P5 e P7).

¹ **Coverage:** numero di volte che una determinata sequenza di DNA viene letta; indica il numero di reads che si ottengono per ogni frammento. Più alto è coverage più alta sarà la confidenza.

E' importante sottolineare che i kit sono disegnati per produrre reads con estremità sovrapposte. In questo modo le varie reads, nelle fasi finali dell'esperimento, potranno essere sovrapposte ri assemblando l'intero genoma di partenza.

- 2) Enrichment (amplificazione):** I frammenti sono poi stati sottoposti a 7 cicli di PCR per amplificare il numero di reads. La lunghezza e la purezza del DNA è stato successivamente valutata mediante il Fragment instrument (Advanced Analytical Technologies, Ankeny, IA). In questo modo sono stati rimossi tutti i frammenti di lunghezza non desiderata e tutti gli eventuali dimeri di adattatori che possono formarsi. La lunghezza considerata ottimale era di 300-400 pb (Fig. 21).

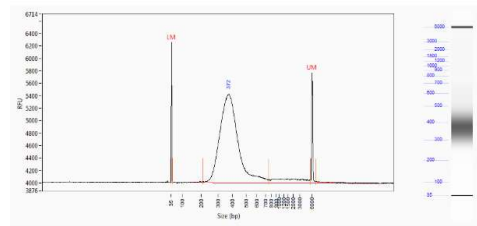


Figura 21. Risultato dell'analisi dei frammenti mediante fragment instrument in cui viene mostrata la lunghezza ottimale delle reads.

I prodotti della PCR sono a questo punto mischiati in un solo pool, consentendo un sequenziamento contemporaneamente di 10-15 campioni (multiplex sequencing).

- 3) Clusterizzazione (5 ore) e Sequenziamento (2-3 giorni):** I campioni sono stati, prima caricati sul cBOT per la clusterizzazione e successivamente sequenziati mediante HiSeq 4000. I campioni vengono caricati su vetrini in cui sono presenti oligonucleotidi (flow-cell) che possono appaiarsi con i frammenti da sequenziare. A tal fine esistono dei frammenti adesi alle flow-cell (frammenti P5 e P7) che sono complementari agli adattatori P5 e P7 presenti sui filamenti del DNA da sequenziare. P5 e P7 sono le regioni che permettono di ancorare il frammento di DNA alle flow cell e sono anche utilizzati come primer per l'amplificazione. Una volta che i frammenti si sono legati alle flow cell inizia il processo definito "Cluster Amplification", al termine del quale dove c'era un frammento ibridato ce ne saranno milioni, ovvero da una copia del DNA di partenza si ottengono molteplici copie. Nella piattaforma usata in tale lavoro, l'amplificazione avviene secondo il metodo "bridge": la DNA polimerasi sintetizza un filamento complementare, la doppia elica formata viene successivamente denaturata, in tal modo il filamento singolo può legarsi ad un altro primer adiacente formando un ponte, a questo punto la DNA polimerasi può sintetizzare nuovamente un filamento complementare. Il processo si ripeterà per numerose volte. Dopo vari cicli di amplificazione bridge si creano milioni di gruppi (clusters) ciascuno con milioni di copie della stessa molecola di DNA, creando dei veri e propri cloni (Fig. 22).

In questa fase non è ancora avvenuto il sequenziamento ma è stato preparato il materiale da sequenziare.

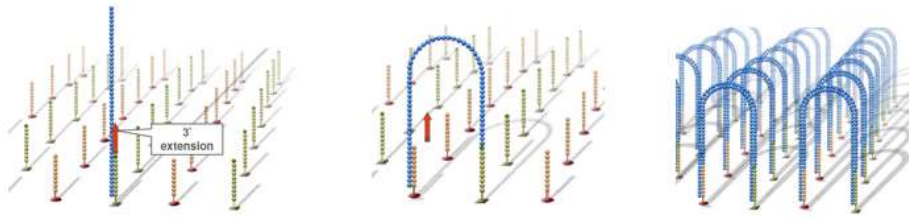


Figura 22 Clusterizzazione mediante metodo bridge.

Il sequenziamento usato è di tipo single-end read, ovvero il sequenziamento avviene partendo da una sola estremità del frammento, ed è eseguito per sintesi (SBS). Ciò consente una notevole riduzione dei costi rispetto al sequenziamento di tipo paired-end reads, in cui il sequenziamento avviene a partire da entrambe le estremità e prosegue in direzioni opposte. Quest'ultimo è molto più accurato e sensibile, in quanto facilita le successive fasi di *alignment*, consentendo di rilevare delezioni, duplicazioni o inserzioni nel DNA del paziente.

Il sequenziamento per sintesi (SBS): una polimerasi inizia a sintetizzare il filamento complementare a partire dall'estremità 3' libera. I cluster che via via si formano consentono di avere milioni di sequenze vicine e identiche. Ognuno dei quattro deossinucleotidi aggiunti alla catena complementare in via di sintesi è marcato con uno specifico fluorocromo, che emette una fluorescenza diversa. Un rilevatore registra la fluorescenza emessa in ogni punto della flow-cell, ed un sistema di uscita capta i segnali fluorescenti, fornendo la sequenza esatta dei nucleotidi.

4) Analisi dei dati. Innanzitutto le reads sono allineate ad un genoma *reference* mediante l'algoritmo Burrow-Wheeler aligner (BWA).

In particolare, l'*alignment* e i filtri sono stati applicati come descritto da Scheinin I. et al. Brevemente, l'intero genoma è stato suddiviso in 26000 bins di misura specifica (100 kb), corrispondenti a 32 segmenti. Il numero di bins per ciascun segmento è confrontato con il numero di bins di un DNA *reference*, ciò consente di rilevare variazioni del numero di copie alleliche. I risultati sono stati forniti come \log_2 ratio. Una complessa analisi informatica, con diversi metodi di correzione, è stata eseguita per ottenere un plot grafico che ha consentito una più facile interpretazione dei risultati. Oscillazioni dallo zero sono state considerate risultati reali solo per valori di *cut off* > di 0.36 per le amplificazione e < di 0.36 per le delezioni. Sono stati considerati risultati positivi solo CNV di dimensione >5 Mb, ad eccezione delle regioni coinvolgenti geni ben noti nella patogenesi della LLC.

3.3 ANALISI STATISTICA

L' Overall survival (OS) è stato calcolato come l'intervallo di tempo dalla data della diagnosi fino alla data di decesso o dell'ultimo follow-up. Il tempo al primo trattamento (time to first treatment, TTFT) è stato calcolato dal momento della diagnosi all'inizio del trattamento. L' analisi statistica è stata valutata tramite il metodo di Kaplan Meier e le caratteristiche prognostiche sono state comparate usando il "log-rank test".

Per valutare il grado di concordanza tra i vari approcci diagnostici, è stata calcolata la costante di kappa di Cohen, usando il test esatto di Fisher a due code (coefficiente k valore: k=0.81-1.00 eccellente; k=0.61-0.80 buono; k=0.41-0.60 scarso, k=0.21-0.40 insufficiente). L'analisi FISH è stata considerata il *golden test*.

p value ≤ 0.05 era indice di differenza statisticamente significativa.

4.RISULTATI

4.1 PROGETTO 1:

4.1.1 Analisi Citogenetica Convenzionale (CC) e FISH

Come mostrato in maggiore dettaglio nella tabella 7, il cariotipo e l'analisi FISH è stata eseguita con successo in tutta la coorte di pazienti. Tra di essi, 9/10 mostravano un cariotipo anomalo e almeno un'anomalia è stata rilevata mediante FISH in ciascun paziente. Ad eccezione del paziente CLL3, che mostrava cariotipo normale, nei rimanenti casi, il bandeggio cromosomico ha rilevato la presenza di una o più anomalie. In accordo con le linee guida ISCN 2016 (Shaffer et al., 2016), è stato definito il cariotipo complesso in 2/10 pazienti (CLL8 e CLL10), entrambi alla diagnosi. Da notare, l'analisi citogenetica ha mostrato del(13q) come traslocazione t(11;13)(q22;q14) in CLL1 (1/14 metafasi) e come t(9;13)(q13;q12) in CLL5 (4/11 metafasi). Inoltre un paziente (CLL4) mostrava traslocazioni coinvolgenti *breakpoint* 17p13 nel 70% delle metafasi analizzate (7/10) (Fig. 23).

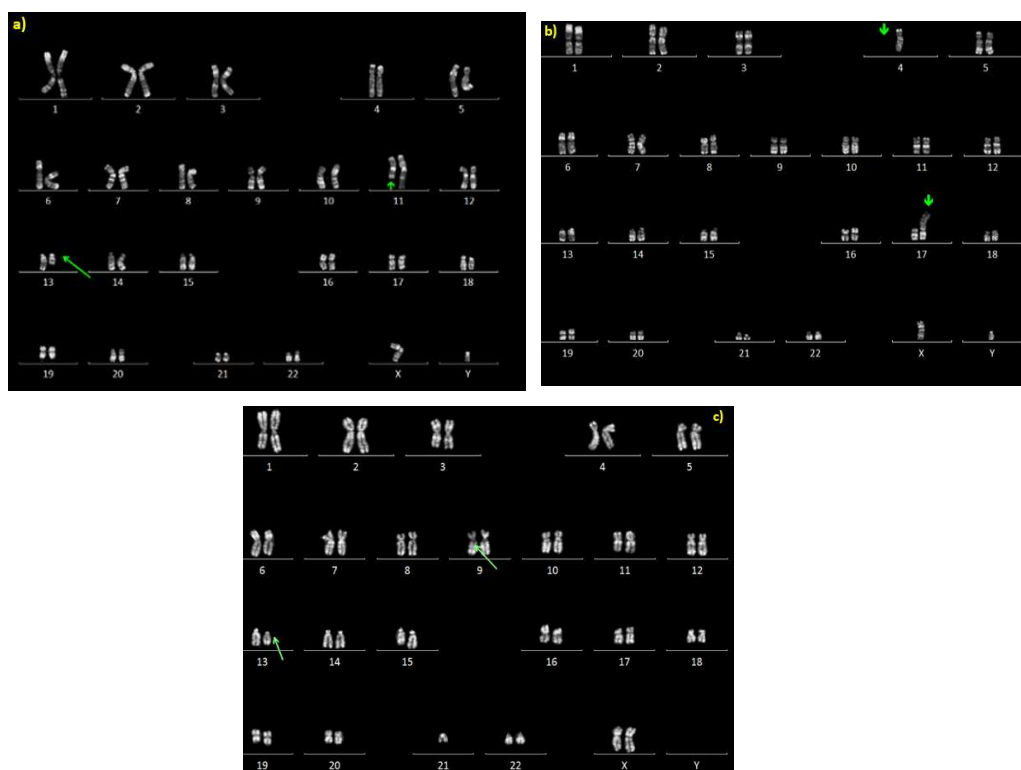


Figura 23 (a) Cariogramma del paziente CLL1 con t(11;13)(q22;q14) (1/14 metafasi); (b) cariogramma del paziente CLL4 che mostrava traslocazioni coinvolgenti *breakpoint* 17p13 in 7/10 metafasi analizzate; (c) CLL5 con t(9;13)(q13;q12) in (4/11) metafasi.

Pts	Cariotipo	FISH	MLPA	Cytosure Haematological Cancer aCGH +SNP array	Low Pass Sequencing
CLL1	46,XY,t(11;13)(q22;q14)[1]/46,XY[14]	del(13)(q14) (locus <i>DLEU</i>) [20%]	loss13q14.2 (?)	arr[hg19] 13q14.2q14.3(49,466,784- 51,841,350)x1 (?) [size: 2,37 Mb]	arr[hg19]13q14.2q14.3(49,800,000- 51,400,000)x1 [size: 2,15 Mb] arr[hg19]3p21.31(46,800,000- 48,680,000)x1 [size: 1,08 Mb] arr[hg19]18p11.32p11.31(200,000- 660,000)x1 [size: 0,460 Mb]
CLL2	46,XY,del(11)(q21)[4]/46,XY[11]	del(11)(q22) [59%]	loss11q22.3- q23.1 (?)	arr[hg19] 11q14.1q23.3(77,484,055- 118,095,900)x1 [size: 40.61 Mb]	arr[hg19]11q14.1q23.3(77,700,000- 118,100,000)x1 [size: 40.4 Mb]
CLL3	46,XX[15]	del(13)(q14) I clone: <i>RB1</i> + <i>DLEU</i> [11%] II clone: loss <i>DLEU</i> [32%]	undetected loss13q14.2 (?)	clone I: arr[hg19] 13q14.2q14.3(47,702,841- 52,893,869)x1 [size:5,08 Mb] clone II: arr[hg19] 13q14.2q14.3(50,394,026- 51,572,737)x1 [size:1,43 Mb] CN-LHO: arr[hg19] 11q14.3q22.3(90,823,090- 104,075,154)x2 hmz	clone I: arr[hg19] 13q14.2q14.3(47,702,841-52,893,869)x1 [size:5,06 Mb] cloneII: arr[hg19]13q14.2q14.3(50,600,000- 51,000,000)x1 [size 0.400 Mb]

[Tabella 7continua pagina seguente]

CLL4	45,XY,-4,der(17)t(4;17)(q21;p13)[7]/46,XY[3]	del(11)(q22) [23%] del(17)(p13) [46%]	undetected loss17p13.1	arr[hg19] 11q13.4q24.2(73,892,580- 125,893,783)x1 (?) <i>[size 52 Mb]</i> arr[hg19] 17p13.3p11.2(10,152- 18,788,032)x1 <i>[size 18.78 Mb]</i> arr[hg19] 4p16.3p15.1 (745,337-41,099,452)x1 arr[hg19] <i>[size 34,66 Mb]</i> 4p14(37,256,723- 40,465,695)x3 <i>[size 3.54 Mb]</i>	Undetected arr[hg19]17p13.3p11.2(200,000- 18,900,000)x1 <i>[size 18 Mb]</i> arr[hg19]4p16.3p15.1(100,000- 34,900,000)x1 <i>[size 34,08 Mb]</i> arr[hg19]4p14p14(36,100,000- 40,600,000)x3 <i>[size 4.05 Mb]</i>
CLL5	46,XX,t(9;13)(q13;q12)[4]/46,XX[11]	del(13)(q14)[11%]	undetected	undetected	undetected
CLL6	46,XY,del(11)(q22)[9]/46,XY[1]	del(11)(q22) [23%] del(13)(q14) [35%]	undetected loss13q14.2 (?)	arr[hg19] 11q14.3q24.2(90,979,174- 124,563,730)x1 (?) <i>[size 35,58 Mb]</i> arr[hg19] 13q14.11q22.1(42,230,311- 75,302,312)x1 (?) <i>[size 33,07 Mb]</i>	arr[hg19]11q14.3q24.2(90,979,174- 124,563,730)x1 <i>[size 35,58 Mb]</i> arr[hg19]13q14.3q22.1(53,200,000- 75,302,312)x1 <i>[size 22,02 Mb]</i>

[Tabella 7continua pagina seguente]

CLL7	47,XY,+12[8]/46,XY[2]	Trisomia 12 [50%]	Trisomia 12	arr[hg19] 8p23.2(3,079,133- 3,858,098)x1 [size 1.21 Mb]	arr[hg19]8p23.2p11.2(2,900,000- 3,905,050)x1 [size 1.07 Mb]
				arr[hg19] 12p13.33q24.33(151,196- 133,773,393)x3 [size 133,62 Mb]	arr[hg19]12q13.33q24.33(200,000- 133,800,000)x3 [size 135 Mb]
CLL8	48,XY,+12,+19[1]/48,sl,t(8;9)(q24;p12)[9]	del(13)(q14) I clone (DLEU) [36%] II clone (RBI+ DLEU) [22%] Trisomia 12 [51%]	loss13q14(?) undetected Trisomia 12 (?) Trisomia 19	arr[hg19] 13q14.2q14.3(50,500,242- 51,374,099)x1 [size 873,68 kb] undetected arr[hg19] 12p13.33q24.33(151,196- 133,773,393)x3 [size 133,62 Mb] arr[hg19] 19p13.3q13.43(96,947- 59,057,705)x3 [size 58,96 Mb]	arr[hg19]13q14.2q14.3(50,600,000- 51,100,000)x1 [size 0,500 1 Mb] undetected arr[hg19]12q13.33q24.33(200,000- 133,800,000)x3 [size 135 Mb] arr[hg19]19p13.2q13.43(7,500,000- 56,900,000)x3 [size 49.4 Mb]
CLL9	46,XX,add(4)(p16)[7]/46,idem,del(11)(q13q25) [4]	del(11)(q22) [32%]	loss11q22.3 (?)	arr[hg19] 11q22.1q24.1(99,204,552- 122,568,934)x1 (?) [size 23.36 Mb]	arr[hg19]11q22.1q23.3(99,300,000- 116,700,000)x1 [size 17 Mb]

[Tabella 7continua pagina seguente]

		del(13)(q14) [88%]	loss13q14.2	arr[hg19] 13q14.2q14.3(48,660,591-51,524,424)x1 <i>[size 2.75 Mb]</i>	arr[hg19]13q14.2q14.3(48,600,000-51,500,000)x1 <i>[size 2.9 Mb]</i>
		del(17)(p13) [5%]	undetected	arr[hg19] 17p13.3p11.2(226,042-22,198,674)x1 (?) <i>[size 21.97 Mb]</i>	undetected
				arr[hg19] 4p16.3p15.2(106,265-27,547,154)x1 <i>[size 27.55 Mb]</i>	arr[hg19]4p16.3p15.2(100,000-27,400,000)x1 <i>[size 27.03 Mb]</i>
				arr[hg19] 7q21.11q36.3(78,677,259-158,986,112)x3 <i>[size 80.23 Mb]</i>	arr[hg19]7q21.11q36.3(79,000,000-159,100,000)x3 <i>[size 80.01 Mb]</i>
				arr[hg19] 20q11.23(34,515,175-36,733,733)x1 <i>[size 2.22 Mb]</i>	arr[hg19]20q11.23q11.23(34,500,000-36,800,000)x1 <i>[size 2.3 Mb]</i>
				CN-LOH: arr[hg19] 20q11.21q12(30,476,153-40,604,606)x2 hmz	
CLL10	42-45,X,-Y,i(3)(q10)[3],add(8)(p22),del(17)(p13)[CP5][5]/46,XY[4]	del(17)(p13) [59%]	loss17p13	17p13.3p11.2(10,152-18,980,358)x1 <i>[size 19,19Mb]</i>	arr[hg19]17p13.3p11.2(10,150-18,900,000)x1 <i>[size 18.14 Mb]</i>

[Tabella 7continua pagina seguente]

				arr[hg19] 3p26.3p12.2(115,283- 81,195,890)x1 <i>[size 81.08 Mb]</i>	arr[hg19] 3p26.3p12.2(115,283- 81,195,890)x1 <i>[size 81.08 Mb]</i>
				arr[hg19] 3q11.1q29(93,771,863- 197,946,575)x3 <i>[size 104.14 Mb]</i>	arr[hg19] 3q11.1q29(93,771,863- 197,946,575)x3 <i>[size 104.14 Mb]</i>
				arr[hg19] 8q21.12q24.3(79,507,245- 146,147,478)x3 <i>[size 66.64 Mb]</i> arr[hg19]	arr[hg19] 8q21.12q24.3(79,500,000- 146,200,000)x3 <i>[size 66.70 Mb]</i>
TOT.		17	12	24 (9/11 abs addizionali +2 CN-LOH)	24 (11/24 abs addizionali)

Tabella 7. Risultati Cariotipo; FISH;MLPA; aCGH+SNP array; LPS, Cariotipizzazione molecolare basata su tecnologia NGS (Illumina)

In tre casi, la citogenetica convenzionale non è stata in grado di rilevare le anomalie rinvenute in FISH, ovvero del(11q) in CLL4, del(13q) in CLL6 ed in CLL8, ma in due pazienti il bandeggio cromosomico ha dimostrato una notevole complessità genomica mentre la FISH svelava, per ciascun paziente, una sola anomalia ad alto rischio (CLL9 e CLL10) (Tab. 8). In FISH, l'anomalia più comunemente rilevata era la del(13q)(q14) (60%), seguita dalla del(11q)(q22) (40%), del(17p)(13) (30%), e dalla trisomia 12 rilevata in soli 2 pazienti. Dei 6 pazienti con del(13q)(q14), tutti mostravano delezione monoallelica ma in due casi, la delezione coinvolgeva solo il locus *DLEU* (CLL1 nel 20% delle cellule e CLL5 nel 11% delle cellule), in altri due casi la delezione coinvolgeva oltre al locus *DLEU* anche il locus *RBI* (CLL6 nel 35% delle cellule e CLL9 nel 88% delle cellule), mentre nei restati due casi è stata osservata una condizione di mosaicismo, ovvero la contemporanea presenza di due cloni, uno con la delezione del solo locus *DLEU* ed un secondo clone con una delezione più ampia che coinvolgeva anche il locus *RBI* (CLL3 e CLL8). Maggiori dettagli sono riportati nella tabella 8.

ID paziente	FISH (%)	aCGH +SNP arrays (Cytosure Haematological Cancer)		
			Size	Gene
CLL1	del(13)(q14)x1, coinvolgente solo <i>DLEU</i> (20%)	del(13)(q14)x1	size 2.37	<i>DLEU</i>
CLL2	del(11)(q22)x1	del(11)(q22)x1	size 40.61 Mb	<i>ATM BIRC3</i>
CLL3	del(13)(q14)x1 con 2 cloni I clone: delez. <i>DLEU + RBI</i> (11%) II clone: delez. <i>DLEU</i> (32%)	(13)(q14)x1	5.06 Mb	<i>RBI + DLEU</i>
		del(13)(q14)x1	1.43Mb	<i>DLEU</i>
CLL4	del(11)(q22)x1 (23%) del(17)(p13)x1 (46%)	del(11)(q22)x1	52 Mb	<i>ATM, BIRC3</i>
		del(17)(p13)x1	18.78 Mb	<i>P53</i>
CLL5	del(13)(q14)x1 <i>RBI + DLEU</i> 11%	Undetected		
CLL6	del(11)(q22)x1 23% del(13)(q14)x1 <i>RBI + DLEU</i> 35%	del(11)(q22)x1	33.58 Mb	<i>ATM, BIRC3</i>
		del(13)(q14)x1	33.07 Mb	<i>RBI + DLEU</i>
CLL7	Trisomia 12 (50%)	Trisomia 12	133 Mb	---
CLL8	Trisomia ia12 (51%) del(13)(q14)x1 con two clones I clone: <i>DLEU</i> (36%) II clone: <i>RBI + DLEU</i> (22%)	Trisomia 12	133 Mb	---
		del(13)(q14)x1	873.68 Kb	<i>DLEU</i>
	del(13)(q14)x1 <i>RBI+DLEU</i> (88%)	del(13)(q14)x1	2.75 Mb	<i>RBI +DLEU</i>

CLL9	del(17)(p13)x1 (5%)	del(17)(p13)x1	21.97 Mb	<i>P53</i>
	del(11)(q22)x1 (32%)	del(11)(q22)x1	23.36Mb	<i>ATM, BIRC3</i>
CLL10	del(17)(p13)x1 (59%)	del(17)(p13)x1	19.19Mb	<i>P53</i>

Tabella 8. Sono riportate le caratteristiche delle anomalie ricorrente rivenute mediante FISH ed aCGH. *Abbrev.* Del., delezione; (del)x1: delezione monoallelica.

La concordanza tra i risultati di citogenetica classica e FISH è risultata piuttosto alta. In un unico caso è stata osservata una completa discordanza, ovvero nel paziente CLL3 in cui il bandeggio cromosomico mostrava cariotipo normale mentre in FISH è stata rilevata del(13q).

Inoltre la citogenetica classica ha consentito di svelare anche anomalie aggiuntive oltre ai 4 loci scrinati dalla FISH, come trisomia 19, anomalie sul braccio corto del cromosoma 4 e del cromosoma 8 e iso(3)(q10) (Tab. 7).

Per valutare l'efficacia della MLPA, aCGH+SNP e LPS, rispetto ai due approcci diagnostici convenzionali, è stato calcolato il grado di "agreement", , mediante il calcolo statistico del coefficiente kappa, tra di essi e l'analisi FISH eseguita attraverso il pannello di sonde LLC standard [del(13q), +12, del(11q), del(17p)] (Tab. 9).

Metodi	Agreement	Coefficiente kappa di Cohen
FISH vs MLPA	good	k=0,647 (SE=0.108)
FISH vs aCGH	very good	k=0,875 (SE=0.070)
FISH vs LPS	good	k=0.785 (SE=0.100)

Tabella 9. Coefficiente kappa calcolato tra i risultati ottenuti dalla FISH (golden test) ed i risultati ottenuti dalle altre tre piattaforme

4.1.1 CNVs analisi: confronto tra metodi.

Dalla combinazione di tutte le metodiche, sia approcci convenzionali che innovati, sono state individuate un totale di 28 anomalie cromosomiche, escludendo la CN-LOH (Tab. 7). Il 39% di esse (11/28) erano anomalie non ricorrenti della LLC, rilevate in 5/10 pazienti, e quindi fuori dal pannello FISH standard

testato. Tali lesioni erano individuate prevalentemente mediante aCGH +SNP arrays e LPS. In nessun caso è stata osservata una condizione di cromotripsia.

La MLPA ha rilevato il minor numero di CNV (12/28) ed è risultata la tecnica con la più bassa sensibilità tra tutti gli approcci usati (Tab. 7). Comparando i risultati ottenuti con la FISH, sono state rilevate discrepanze in 6 su 10 pazienti ed in tutti i casi le anomalie individuate dalla FISH erano rinvenute in una piccola percentuale di cloni, *range* tra il 8% ed il 23%, e quindi al di sotto del *cut off* di sensibilità della MLPA (Tab. 10). Bisogna inoltre sottolineare che quando la taglia dei cloni era approssimativamente intorno al 40%, tale metodica forniva risultati poco chiari, troppo vicini al *cut-off* per essere definiti con certezza, pertanto era necessario confermarli in FISH. Mediante MLPA, l'unica anomalia aggiuntiva rilevata, non inclusa nel pannello FISH standard, era la trisomia 19 in CLL8.

	FISH+	FISH-	tot.	agreement
MLPA+	11	0	11	Good
MLPA -	6	25	31	
Tot.	17	25		k=0.647

Tabella 10. Confronto tra FISH e MLPA (two-tailed Fisher's exact test). Il coefficiente kappa calcolato dimostra una buona concordanza tra i metodi.

L'analisi dei CNV eseguita mediante la piattaforma array aCGH + SNP array (Cytosure Haematological Cancer platform, 8x60k) e mediante la nuova metodica di cariotipizzazione molecolare basata sulla tecnologia NGS, che consente di ottenere un profilo di CNV con un basso *coverage* (0,17x e ~12x10⁶ reads per campione), ha rilevato il maggior numero di CNV, individuando sia anomalie ricorrenti che aberrazioni non testate dal pannello FISH standard (85% di CNV, 24/28 per entrambe le metodiche). Solo un caso ha mostrato un profilo di CNV normale, mediante entrambe le metodiche. Tutti gli altri pazienti mostravano anomalie con un minimo di un'unica anomalia fino alla contemporanea presenza di 6 anomalie (in CLL9).

Rispetto alle amplificazioni le delezioni ("loss") sono risultate più frequenti, 16 *loss* vs 6 *gain* per aCGH e 17 *loss* vs 6 *gain* per LPS.

Nello specifico l'analisi mediante le due metodiche di *genome wide* ha rilevato il 29% di CNV focali (7/24), ovvero con una dimensione inferiore a 5 Mb. Nella maggior parte dei casi (4/7) coinvolgevano la regione cromosomica 13q14 (size media: 1,88 Mb). Gli altri CNV focali individuati erano: loss8p23, loss20q11 e gain4p14 (size media: 2,23 Mb). Sul braccio lungo del cromosoma 7 in CLL9 è stato, invece, rilevato il CNV con dimensione maggiore (80,23 Mb).

Le incidenze e le caratteristiche delle quattro anomalie LLC ricorrenti, rilevate dall'analisi mediante aCGH e LPS, sono riportate in maggiore dettaglio nella tabella 7 e 8. Come già rilevato dalla FISH, la del(13q) era l'anomalia più frequente (5/10 pazienti) e tra le anomalie ricorrenti risultava quella caratterizzata dalla

dimensione minore (size media: 2,44 Mb). La minima regione deleta (MRD), visibile in CLL8, aveva una dimensione di 873.68 kb e coinvolgeva solo il locus *DLEU*. Come mostrato dal BAF plot ottenuto dall'analisi degli SNP, l'anomalia era sempre presente in eterozigosi. Interessante notare che nel paziente CLL3 gli aCGH e la LPS hanno individuato entrambi i cloni con del(13q) di tipo I e di tipo II rilevati dalla FISH. Difatti sul grafico del profilo dei CNV ottenuto dall'analisi *genome wide* erano visibili due diversi *breakpoint* sul cromosoma 13, indice di due distinte popolazioni subclonali: un clone (11%) con un'ampia regione deleta che coinvolgeva sia il locus *DLEU* sia il locus *RBI* (dimensione: 5.13 Mb), quindi delezione di tipo II, ed un clone (32%) con la delezione del solo locus *DLEU*, quindi di dimensione minore (delezione di tipo I, dimensione: 992,37 Mb) (Fig. 24).

Una condizione di mosaicismo simile è stata rilevata anche nel CLL8: clone I con del(13)(q14) coinvolgente entrambi i locus *DLEU* e *RBI* nel 22% delle cellule analizzate, e delezione del solo locus *DLEU* nel 32% delle cellule. L'analisi dei CNV mediante microarray e LPS ha rilevato solo la delezione del locus *DLEU* presente nel clone maggioritario.

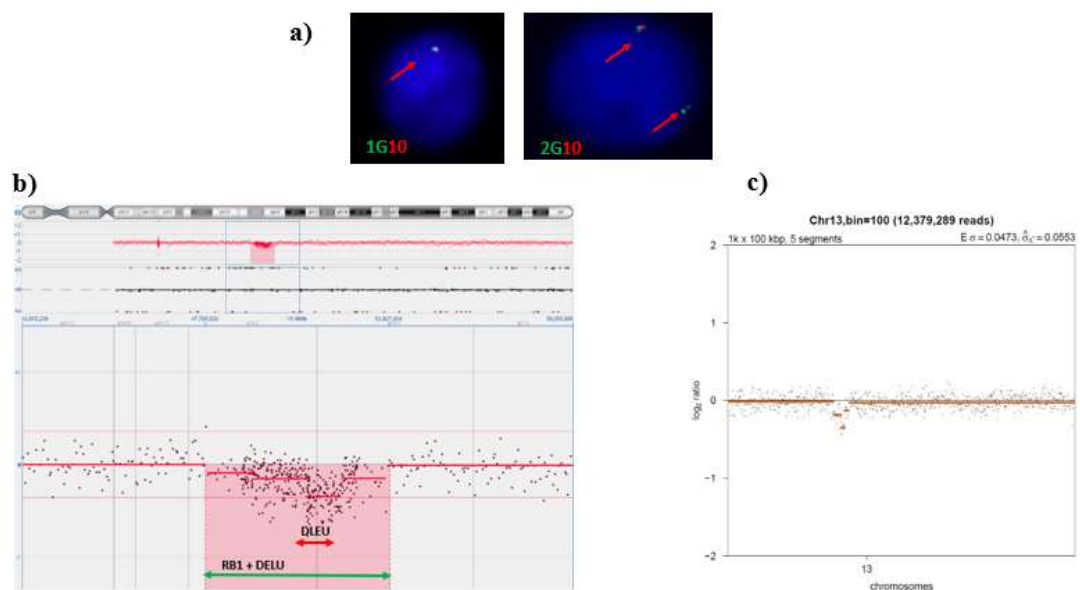


Figura 24. (a) FISH interfascica mostra due cloni distinti nel paziente CLL3: delezione di tipo I (32% dei nuclei) e delezione di tipo II (nel 11% dei nuclei). Il segnale rosso indica *DLEU*, il segnale verde indica il locus *RBI*, il pattern 1G10: delezione monoallelica di entrambi i locus, il pattern 2G10: delezione del solo locus *DLEU*. (b): Ideogramma del cromosoma 13 e plot del profilo dei CNV rilevati mediante aCGH+SNP array. I due breakpoint a livello 13q14 indicano la presenza di due popolazioni cellulari con due delezione di dimensione diversa: delezione di tipo I (size: 992,37 Mb) e di tipo II (size: 5.13 Mb). (c) Il grafico mostra il profilo di CNV del cromosoma 13 ottenuto mediante LPS. I due diversi breakpoint mostrano i due cloni con del(13q)(14) di tipo I e di tipo II.

La del(11)(q22) è stata, invece, rilevata in 4 pazienti mediante aCGH e in 3 pazienti mediante LPS. In tutti i casi la delezione coinvolgeva un'ampia regione (dimensione media di 31,98 Mb), che includeva i geni *ATM* e *BIRC3*. La del(17)(p13) è stata rilevata in tre pazienti mediante aCGH e in due paziente mediante

LPS. In tutti i casi, la delezione mostrava una dimensione media di 18,98 Mb e coinvolgeva sempre il gene *TP53*.

L'*agreement* calcolato tra l'analisi FISH e l'analisi aCGH mostravano un alto grado di concordanza ($k = 0,875$) per i 4 loci testati dal pannello FISH standard (Tab. 11). Difatti, gli unici risultati discordanti riguardavano il paziente CLL5 che mostrava in FISH del(13)(q14) nel 11% delle cellule ed il paziente CLL8 in cui la FISH ha rilevato la presenza di due cloni con del(13q)(q14): un clone con delezione di tipo I (36%) ed un secondo clone con delezione di tipo II (22%) (Tabelle 7 e 8), il clone minoritario non è stato rilevato dagli aCGH.

	FISH+	FISH-	TOT	Agreement
aCGH+	14	0	14	Very good
aCGH -	2	25	27	
TOT	16	25		k= 0,875

Tabella 11. Confronto tra FISH ed aCGH (two-tailed Fisher's exact test). Il coefficiente kappa calcolato dimostra una concordanza eccellente tra i metodi.

Sebbene l'analisi statistica ha definito una concordanza eccellente tra la FISH e aCGH, è necessario sottolineare che nei casi in cui le anomalie erano presenti in una bassa percentuale di cloni, tra il 35-25%, il risultato ottenuto dall'analisi mediante aCGH era troppo vicino al *cut off*, e quindi di difficile interpretazione con necessità di conferma mediante FISH. Contrariamente la metodica di cariotipizzazione molecolare NGS mostrava una maggiore sensibilità. Difatti i casi che mediante microarray fornivano risultati di difficile interpretazione risultavano chiaramente rilavabili dall'analisi mediante LPS, un esempio è riportato nell'immagine seguente (Fig. 25).

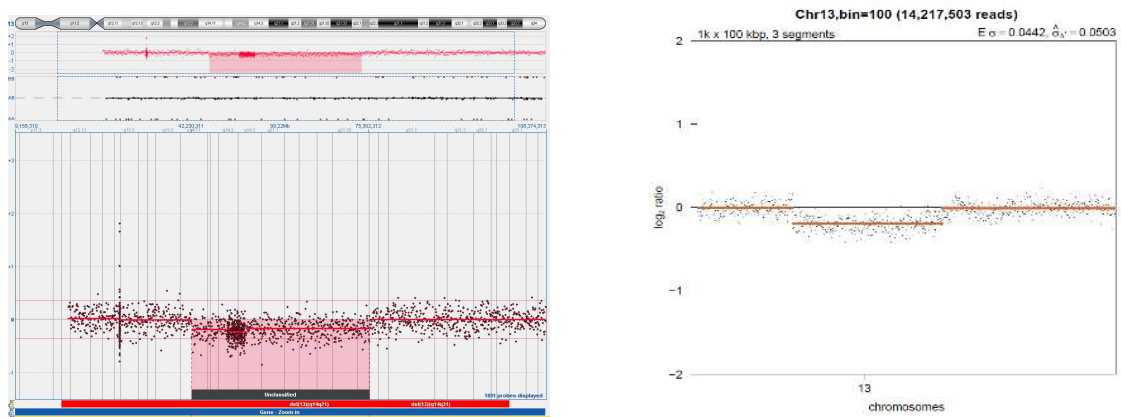


Figura 25. Profili di CNV rilevati dalla piattaforma aCGH (**sinistra**) e dalla LPS (**destra**) per il cromosoma 13 (pts CLL6). Contrariamente ai risultati ottenuti dagli aCGH ($\log_2 \text{ratio} = 0,1647$), la delezione è chiaramente visibile mediante LPS (i bins sono riordinati lungo l'asse delle X secondo la loro posizione genomica, sull'asse delle ordinate è riportata la media normalizzata dei dati trasformati in $\log_2 \text{ratio}$). La percentuale delle cellule anomale rilevate mediante FISH era del 35%.

Dunque la LPS è risultata essere una metodica più sensibile dell'analisi di microarray riuscendo a rilevare anomalie anche al disotto del 25% delle cellule anomale, considerato come il limite di sensibilità degli aCGH.

I risultati discordanti tra LPS e FISH sono stati rinvenuti in soli 3 pazienti e coinvolgevano i loci in 11q,13q e 17p. In tutti i casi la percentuale di cellule anomale era inferiore al 16%. Ad eccezione della del(13q) in CLL5 rivenuta solo mediante FISH, le altre due anomalie erano individuate anche dall'analisi eseguita mediante aCGH tuttavia con risultati di difficile interpretazione poiché ricadevano all'interno del valore di *cut off*. Un esempio è riportato nella figura sottostante (Fig. 26).

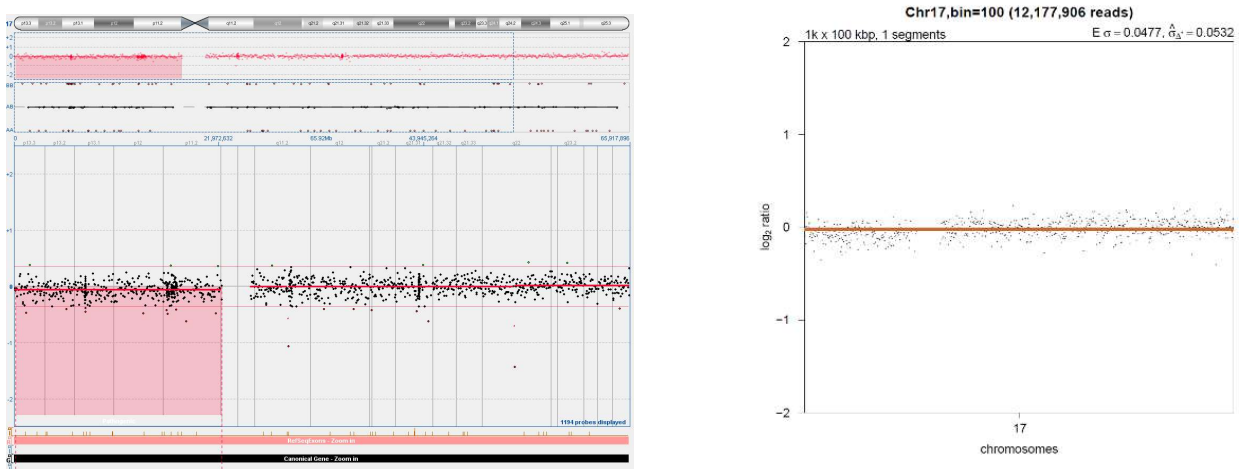
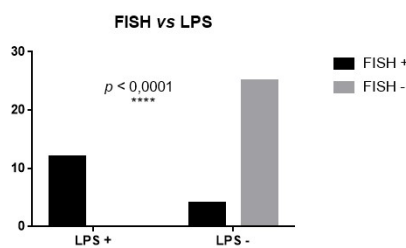


Figura 26 Profilo dei CNV del cromosoma 17 (CLL9). Gli aCGH mostrano solo una minima deviazione dallo zero a livello 17p (**sinistra**). Contrariamente il profilo di LPS non mostra alcuna deviazioni (**destra**). La percentuale di cellule anomale rivenute mediante FISH era dell'5%.

LPS e FISH mostravano un grado di accordo statisticamente buono ($k=0,785$).



	FISH+	FISH-	TOT	agreement
LPS +	12	0	12	Good
LPS -	4	25	29	
TOT	16	25		$k= 0,785$

Figura 27 e Tabella 12. Confronto tra FISH e LPS (two-tailed Fisher's exact test). Il coefficiente kappa calcolato dimostra una buona concordanza tra i metodi.

Infine in considerazione della notevole sensibilità della LPS sono stati eseguiti esperimenti di diluizioni seriali per stabilire il valore di *cut off* necessario per evitare di rilevare falsi positivi. Per tali esperimenti è stato estratto il DNA da due campioni di sangue midollare di pazienti affetti da Mielodisplasia (MDS), per i quali l'analisi citogenetica aveva rilevato, rispettivamente un clone del 100% con trisomia 8 (+8) nel paziente MDS_1 ed un clone di monosomia 7 (-7) nel paziente MDS_2. Si è proceduto con una prima diluizione in cui è stato mescolato in un'unica eppendorf il 95% del DNA di MDS_1 con +8 e il 5% di DNA di MDS_2 con -7, una seconda diluizione con il 90% di DNA di MDS_1 con +8 e il 10% di DNA di MDS_2 con -7, ed una terza diluizione con l'80% di DNA di MDS_1 con +8 e il 20% di DNA del MDS_2 con -7. Tali esperimenti hanno confermato l'elevata sensibilità della LPS dimostrando oscillazioni dallo zero nel plot dell'analisi dei CNV già in presenza del solo 5% di cellule anomale. L'anomalia appariva chiaramente individuabile in presenza di un clone del 20% (Fig. 28). Pertanto, è stato ridotto il *cut-off*, inizialmente settato a +0,36 per i *gain* e a -0,36 per le *loss*. Nello specifico, per le amplificazioni il *cut off* è stato ridotto a +0,1375 mentre le delezioni a -0,152. Inoltre in caso di una bassa percentuale di cellule anomale, tra il 5-20%, il *cut off* è stato posto a -0,03653 per le delezioni e +0,035624 per le amplificazioni. In questi casi, in presenza di anomalie con significato prognostico certo, è opportuno, tuttavia, procedere con ulteriore conferma in FISH.

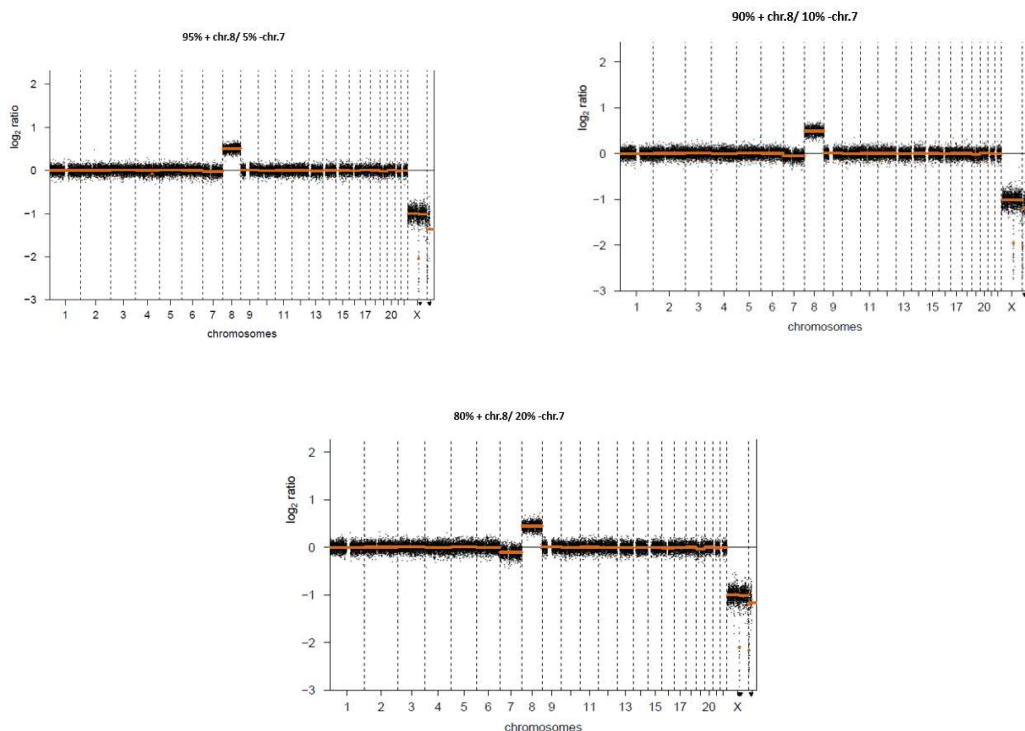


Figura 28: Esperimento di diluizioni seriali eseguiti usando due campioni mielodisplastici, che mostravano rispettivamente, trisomia 8 in MDS_1 e monosomia 7 in MDS_2 in tutte le metafasi analizzate. L'esperimento dimostra l'alta sensibilità della LPS. I grafici rappresentano l'intero cariotipo molecolare. Sull'asse delle ascisse i numeri corrispondono ai 23 cromosomi. Sull'asse delle ordinate è riportata la media normalizzata dei dati trasformati in \log_2 ratio). Deviazioni dallo zero indicano sbilanciamenti (*loss* o *gain*).

4.1.2 ANOMALIE AGGIUNTIVE RIVENUTE MEDIANTE aCGH + SNP array E LPS

L'analisi mediante microarray e LPS consente di valutare il profilo di CNV in tutto il genoma, fornendo una visione globale del cariotipo molecolare. Sono state così rilevate anomalie aggiuntive a quelle routinariamente scrinare mediante FISH. Per evitare falsi positivi sono state escluse dall'analisi, tutte le anomalie con dimensione minore di 5 Mb, ad eccezione delle regioni coinvolgenti geni correlati alla LLC, secondo quanto riportato dalle linee guida di Schouman et al (Shoumans et al, *Gene Chr. Canc.*, 2016). Tutte le anomalie addizionali sono state confermate mediante FISH. Sono state rivenute: *loss* in 8p23 (size di 1.21 Mb) in un paziente, 4p16 (size media, 31,10 Mb) in due paziente e 20q (size 2.22 Mb) in un paziente; *gain* in: 4p14 (size 3.54 Mb), 8q coinvolgente il gene *MYC* (66,64 Mb), in 7q21 (size 80,23 Mb) e trisomia 19. Entrambe le metodiche hanno anche rilevato la presenza di isocromosoma 3 nel paziente CLL10, il cui cariotipo appariva complesso già all'analisi mediante bandeggio cromosomico (Fig. 29).

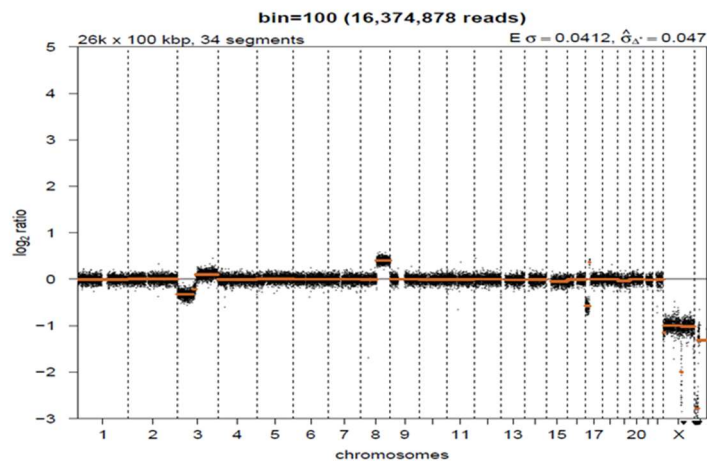
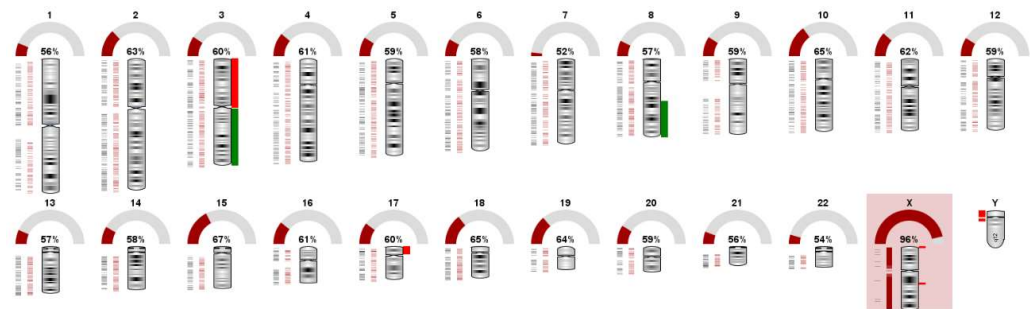


Figura 29: In alto: Cariotipo molecolare rilevato mediante aCGH, (barre rosse indicano delezioni; barre verdi indicano amplificazioni). In basso: Plot dell'analisi di CNV eseguita mediante LPS. Il grafico rappresenta l'intero cariotipo molecolare, sull'asse delle ascisse i numeri corrispondono ai 23 cromosomi. Le deviazioni dallo zero indicano sbilanciamenti. E' evidente la presenza di isocromosoma 3, caratterizzata dalla contemporanea delezione del braccio corto ed amplificazione del braccio lungo.

Sebbene anche l'analisi di citogenetica convenzionale fornisca una visione dell'intero cariotipo non è stato in grado di rilevare non solo lesioni focali (<5Mb) ma anche amplificazione di grande dimensione (es. gain in 7p e 4p).

Da sottolineare che l'analisi mediante LPS ha anche rilevato due anomalie aggiuntive in CLL1, ovvero delezione in 3p e 18q, non rinvenute dagli CGH, ma successivamente confermate da analisi in FISH con sonde BAC.

Considerando le anomalie aggiuntive, l'analisi dei CNV ha consentito di definire cariotipo complesso (\geq di 3 CNV) in 6 pazienti: 5/10 mediante aCGH e 6/10 mediante LPS. Nella maggior parte dei casi (4/6) la complessità genomica era associata ad anomalie ad alto rischio; in un caso era associata a contemporanea presenza di a trisomia 12 e del(13q12) ed in un paziente era associato alla sola del(13q14), ovvero ad anomalia a prognosi favorevole.

Inoltre, la piattaforma di microarray usata in tale lavoro, poiché combina in un unico esperimento aCGH ed SNP arrays ha anche rilevato la presenza in due pazienti di CN-LOH, regioni in cui non vi sono variazioni del numero di copie alleliche, quindi con un profilo di CNV normale, ma con un *pattern* di SNP anomalo. L'interpretazione della CN-LOH è ancora oggi piuttosto difficile a causa della mancanza di linee guida standard da seguire. Sebbene in diversi casi è stato rilevato un profilo di SNP aberrante senza alterazioni di CNV, sono stati considerati risultati positivi solo regioni di CN-LOH in cui almeno il 60% di SNP era in omozigosi e con dimensione maggiore di 10 Mb (Shouman J.et al., *Gene Chrom. Cancer*.2016). Sono state anche considerate tutte le regioni coinvolgenti *loci* frequentemente alterati nella LLC. E' stato pertanto rilevata, CN-LOH a livello della regione 11q14.3q22.3 in CLL3 e a livello 20q11.21q14 in CLL9. In quest'ultimo caso la regione di CN-LOH includeva anche una regione deleta (loss 20q11.23, size 2.22 Mb) (Fig. 30).



Figura 30. In alto: Ideogramma del cromosoma 20. **In basso:** il profilo di CNV da cui emerge delezione sul braccio lungo. Inoltre è riportato anche il BAF plot dell'analisi di SNP che dimostra una regione di CN-LOH (rettangolo rosso) che include anche la regione deleta.

4.2 Progetto 2

4.2.1 Risultati analisi Citogenetica Convenzionale (CC) e FISH

Alla diagnosi o pre-terapia, ovvero al *timepoint 1*, è stata eseguita l'analisi mediante citogenetica convenzionale in 58 pazienti. I cariotipi sono stati descritti secondo la nomenclatura ISCN 2016 (Shaffer LG et al, 2016 ISCN). Nel 12% (7/58) dei casi non è stato possibile eseguire l'analisi per assenza di metafasi, il 65% dei pazienti (33/51) ha mostrato cariotipo normale, il 37% (19/51) cariotipo anomalo di cui sei casi con cariotipo complesso (≥ 3 anomalie) (31,5% 6/19) (Tab. 13 e 14). Inoltre in 19 pazienti è stata eseguita anche l'analisi durante i seguenti *follow up* (Tab. 13 e 14). Il 58% (11/19) dei casi presentava un cariotipo anomalo, sei dei quali mostrava un cariotipo con tre o più anomalie (cariotipo complesso, CK). Ad eccezione di due casi, il cariotipo complesso, sia alla diagnosi che al *follow up*, era sempre associato alla del(17p). Sono riportati in Figura 31 esempi di cariotipi anomali rinvenuti durante l'analisi.

Pazienti [RAI/BINET]	T1		T2		Status clinico
	Cariotipo	FISH	Cariotipo	FISH	
#1 [2/A]	46,XX[3]/ 46,XX, del (13q)[8]	del(13q): 51% del (17p): 12%	46,XX[11]/46,XX,del(13q)[3]44,-X,-X,del(2q),der(3),- 6,add(7q),del(13q),add(15p) ,der(19)t(19q;?),+mar[8]	del(13q): 75% del(17p): 20% del ATM: 20%	stabile
#2 [2/A]	46,XY	NEGATIVA	46,XY[12]/46,XY,add(17p) [2]47,XY,add(17p),+ring?[2]/46,XY,add(1p),+del(1q), del(2)(q11),del(6q),-13,- 14,add(17p),- 20,+2ring?[2]/46,XY,add(1 p),del(6q),der(7),- 17,+mar[1]/46,XY,add(1p), del(1q),del(4)(q11),add(13q)?, -14,der(17)?,+mar1[1]	del(13q): 24% del(17p): 54%	stabile
#3 [1/A]	46,XX[15]/46,XX,ri ng(15?)[4] /45,X,- X,t(1;19)(q?;p?),+de r(19)t(1;1 9),-20[1]	del(17p):20% del ATM:35% del(17p)x1+del ATMx1: 14% del(17p)x2+del ATMx1: 7%	46,XX, ring(15)[16], 91,XXXX,+ring(15)[6]	del(13q): 8% del(17p): 5,5% del ATM: 3%	stabile
#4 [3/C]	Nd	tris12: 47%	47,XX,-2,-3,+12,- 14,+mar1,+mar2+mar3[2]/ 45,X,X,dic(5)?,del(14q)[1]/ 45,XX,der(6)t(6;?),+12,der(14)t(14;?)(q32;?)-19,- 22[1]46,X,- X,del(3p),+mar4[1]/46,X,-	tris12: 46% IGH rearranged	progressio ne

			X,del(1q),-5,+mar5,-mar6[1]46,XX[10]		
#5 [4/C]	46,XY[12] /46,XY,del(1q),der(2)t(2;13)(q?:p11),del(14q)[2]/47,XY,+12[4]/47,XY,del(6q),del(8p),+12,-18[2]	del(13q): 90% del(13q)x1+tris12: 4% del(13q)x2+tris12: 3% del(17p): 43%	46,XY	del(13q): 82% del(17p): 77%	deceduto
#6 [1/A]	46,XY[3]/47,XY,del(3q),der(11)t(11;?)(q?:?),add(13p),+14[7]/47,XY,idem,del(2q),del(3q)[8]	del13q: 19% del ATM: 87%	46,XY[3]/47,XY,der(11)t(11;?)(q?:?),del(3q)add(13p),+14,del(3q)[13]	del(13q): 23% del ATM: 95%	stabile
#7 [0/A]	Nd	del(13q):85%	46,XX[11]/47,XX,+12[3]47,XX,-7,del(10p),+12,der(13)t(13;16)(q13?:q22?),-14,+18,+mar[2]/46,XX,idem,-13[4]	del(13q)x1: 53% del(13q)x2: 3,5% tris12: 17% tris12+del(13q): 10% del(17p):50%	deceduto
#8 [4/C]	46,XY	del(13q): 60% del(17p): 58%	46,XY,-2,del(6q),+15,der(17)t(2;17)(p10;p10),add(18p)	del(13q): 93% del(17p): 91%	deceduto
#9 [4/C]	46,XY[13] /45,XY,-4,der(8)t(4p;8p),t(14;15)(q34;q)-16,i(17)(q10),-18,-21,+mar1,+mar2	del(17p):100% IGH rearranged	/	/	deceduto
#10 [3/C]	46,XY[1]/46,XY,t(2;9)(p14-16?:p21?),del(13q)[3]/45,X,-Y,idem,-17,+der(17)t(Y;17)(q?:p?),1dmin[9]/45,X,-Y,idem,-15,-17,+der(17)t(Y;17)(del(13q): 52% del(17p)x1: 30% del(17p)x2: 22% del ATM+del(17p): 15%	/	/	deceduto

	q?;p?),+mar,1dmin[5]				
#11 [3/C]	46,XX [5]/44,XX ,-3,-6,- 10,-14,- 17,+der(1 9)t(19;?) +mar1,+ma r2[18]	tris12: 85% del(17p): 90%	/	/	in progressio ne

Tabella 13. Sono riportati in tabella i cariotipi complessi rinvenuti alla diagnosi o ai successivi follow up. Per ciascuna paziente è riportato lo stadio RAI e Binet e lo status clinico. *Abbrev.* Nd: not done

Pazienti [RAI/BINET]	T1		T2		Status clinico
	Cariotipo	FISH	Cariotipo	FISH	
#1 [0/A]	46,XY[7]/47, XY,del(11q),+12[8]	tris 12: 87,5% del ATM: 65%	nd	tris12: 70% del ATM:92% del ATM+del(17p): 8%	stabile
#2 [1/A]	Nd	del(11q): 56%	46,XY[20]/92,XXYY[7]/122,XXYY, +.[3]	del(13q): 8% mono12: 7% tris12: 4% del ATM: 88%	stabile
#3 [0/A]	Nd	tris12: 90% del(17p): 62%	47,XX,+12[8]/46,XX,+12,-17[12]	tris12: 78% del17p: 88%	progressione
#4 [2/B]	46,XY,del(13q),add(11q)[14]/46,XY[6]	del(13q): 61% del ATM: 51,5%	46,XY	del(13q): 5% del ATM: 5%	allo-HSCT
#5 [2/B]	46,XY[4]/47,XY,+12[6]	tris 12: 67%	46,XY[17]/47,XY,+12[2]	tris12: 37% del(17p): 8%	stabile
#6 [2/B]	47,XX,+12[1]/47,XX,add(3q)?,+12[7]/46,XX[7]	tris 12: 45% del(13q):16% tris 12+del(13q): 5% del(17p):8%	nd	tris12: 7% del(13q):5% del(17p):10%	stabile
#7 [2/B]	46,XY[20]/47,XY,+12[5]	tris 12: 48% tris 12+del(13q): 10% del(13q): 12% del(17p):8%	nd	tris12: 61% tris12+del(13q): 8% del(13q): 5% del(17p):8%	stabile
#8 [1/A]	46,XX,+12	tris 12: 71%	nd	tris12: 67%	deceduto
#9 [1/B]	46,XY[27]/92,XXYY[3]	Tetraploidy: 10% del(17p):15% del ATM: 7%	/	/	stabile
#10 [4/B]	46,XY,del(13q)	del(13q)x2: 87%	/	/	stabile
#11 [4/C]	46,XY[10]/47,XY,+12[13]	tris12: 37% del(17p)x1:19% del(17p)x2:19%	/	/	stabile
#12 [1/A]	46,XY[9]/46,XY,t(13;17)(q12;p?)[11]	del(13q)x1:4% del(13q)x2: 8,4% del(17p): 13%	/	/	stabile
#13 [2/A]	47,XY,+12[2], 46,XY[8]	tris 12: 24%	/	/	stabile
#14 [1/A]	46,XY der(11q)	del(ATM):78%	/	/	progressione
#15 [0/A]	46,XY	del(13q): 31% del ATM: 89%	46,XY,del(11q)[11]/46,XY,t(1;2)(p32;q34),del(11q)[8]/46,XY[6]	del(13q): 16.5% del ATM: 82%	Stabile

Tabella 14. Sono riportati i cariotipi anomali rinvenuti alla diagnosi o al follow up.

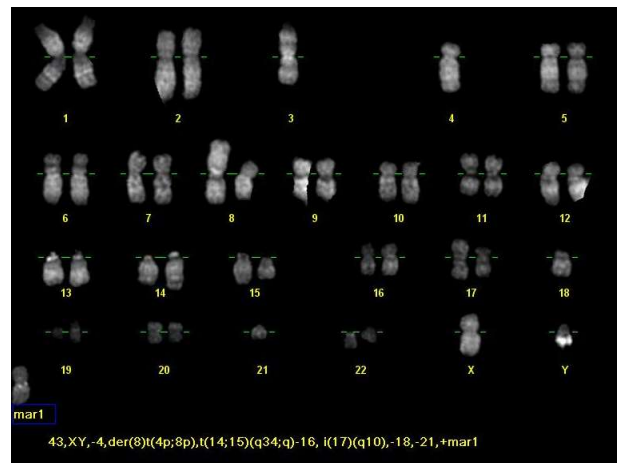
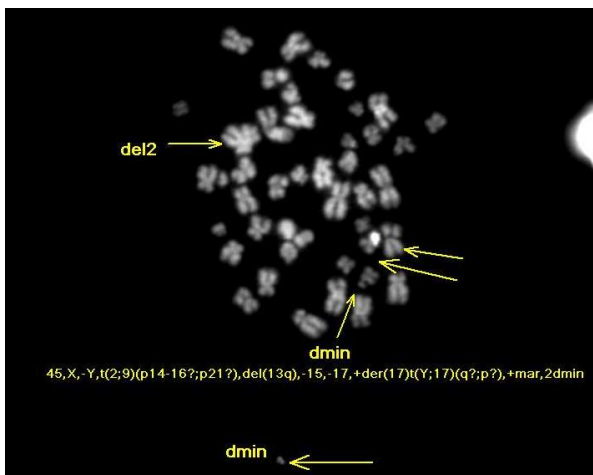
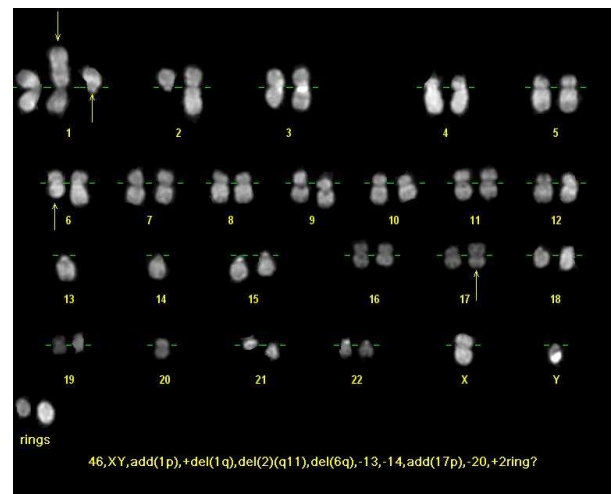
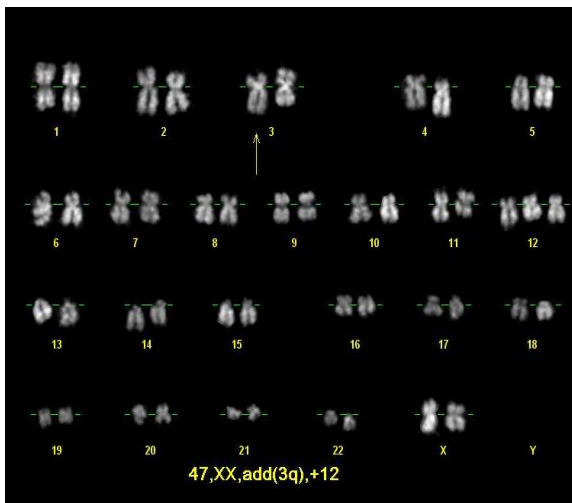
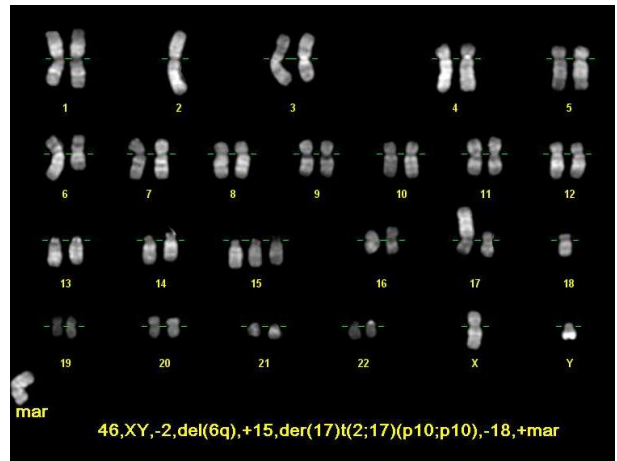
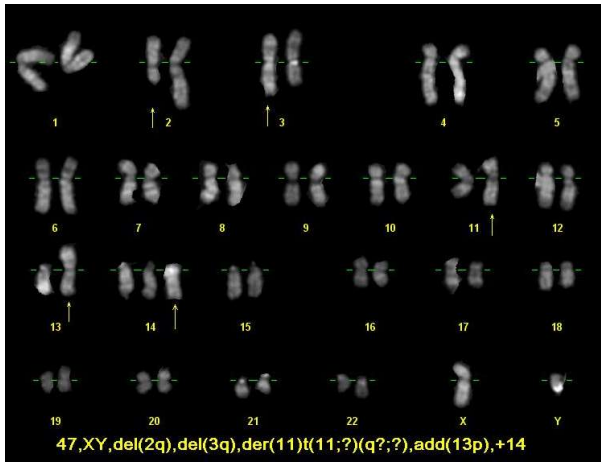


Figura 31: Cariogrammi anomali.

Inoltre, l'analisi mediante bandeggio cromosomico, ha contribuito in alcuni casi a definire la composizione clonale, ovvero distinguere tra condizioni di **monoclonalità** (un clone con una o più lesioni citogenetiche coesistenti) da condizioni di **ITH** (presenza di due o più cloni/subcloni che possono essersi originati da un clone primario mediante dinamiche evolutive branching o lineare). Nella sottostante immagine è riportato un esempio di ITH (Fig. 32).

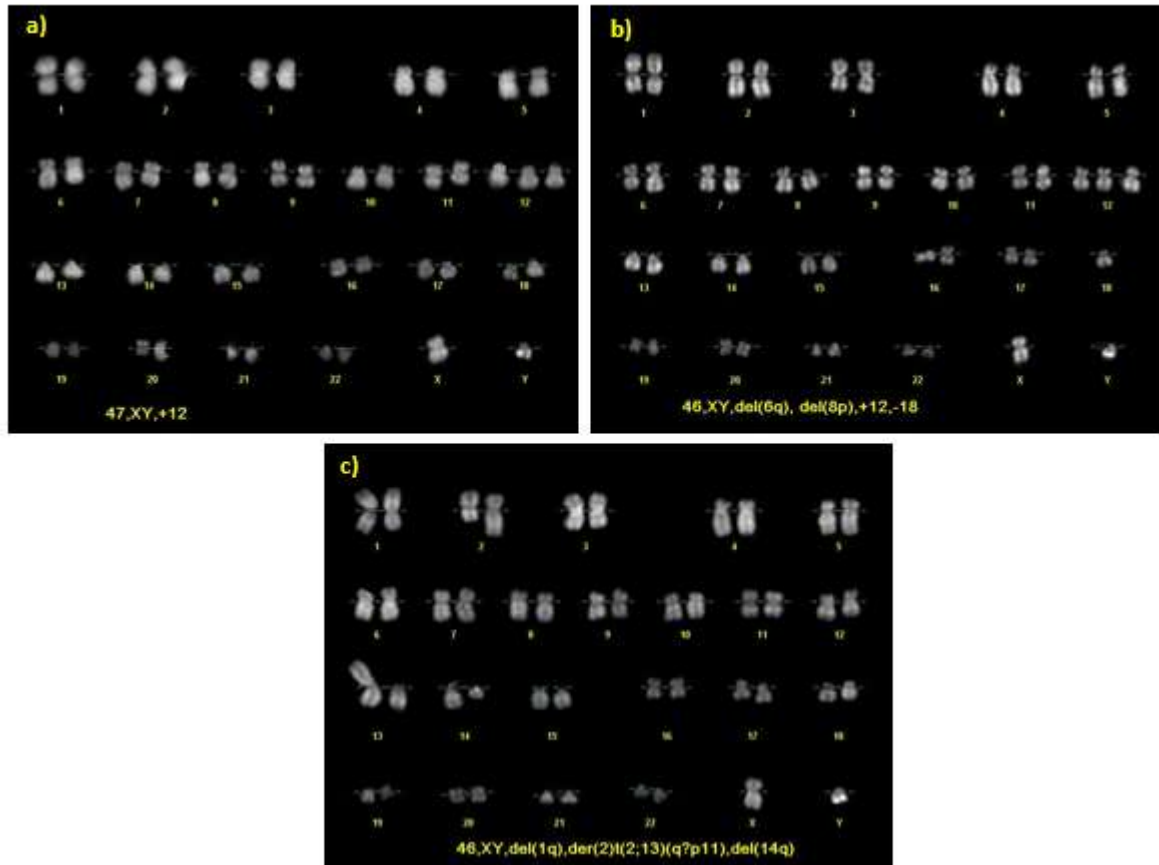


Figura 32. Cariogrammi di un paziente con cariotipo anomalo alla diagnosi in cui è evidente una condizione di ITH. **(a)** clone I con trisomia 12. **(b)** Clone originatosi dal clone I mediante evoluzione lineare **(c)** clone II geneticamente non correlato al clone I.

L'analisi FISH è stata eseguita su tutti i pazienti alla diagnosi e/o pre-terapia e ha evidenziato la presenza di almeno un'anomalia nell'83% dei pazienti (n=87). Nello specifico, nel 37% è stata rilevata una sola anomalia, nel 31% 3 anomalie, nel 12% 2 anomalie e nel 1,9% 4 anomalie co-presenti. La del(13q14) monoallelica è risultata l'anomalia più frequente, seguita dalla del(17p12), trisomia 12 e del(11q22). Da sottolineare che nel 65% dei casi la del(17p) era presente come anomalia subclonale, ovvero inferiore al 20% (range 8-20%). Difatti, solo il 11,5% (n=12) dei pazienti ha mostrato del(17p) in un'alta percentuale di cellule anomale (tasso di positività cellulare medio del 69%, range 41-100%).

La t(14q32) è stata valutata nel 68% dei pazienti (n=71), ed è risultata positiva solo in due casi (range di positività cellulare medio del 6-19%). Inoltre, nel 24% dei casi (n=18) è stato rilevato un *pattern* di ibridizzazione anomalo (1F/1F1O) compatibile con delezione totale o parziale del locus. In tutti i casi con *pattern* anomalo è stato escluso l'eventuale riarrangiamento t(11;14) (q13;q32).

Nell'istogramma seguente (Fig. 33) sono riportate in dettaglio le incidenze delle anomalie citogenetiche ed il tasso di positività cellulare medio calcolato (TPCM) per ciascuna di esse (Fig. 33).

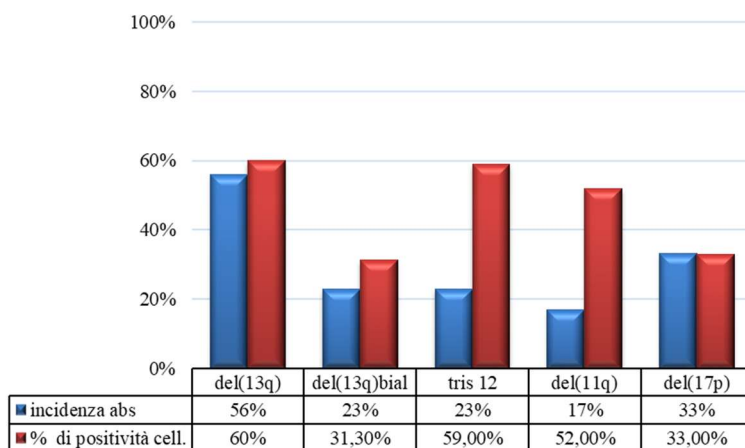


Figura 33. Istogramma con l'incidenza delle anomalie e la percentuale del tasso di positività cellulare medio. Range: del(13q) monoallelica [8-100%], del(13q) biall [6-70%], tris12 [16-90%], del(11q) [8-100%], del(17p) [8-100%]. Abbrev *abs*: anomalie.

Anche la FISH, quale analisi su singola cellula, ha permesso di eseguire un'approfondita analisi di composizione clonale, quindi discriminare tra condizioni di monoclonalità e subclonalità/biclonalità (ITH). Nel presente lavoro sono state testate insieme la coppia di sonde *XL del(13q)(DLEU/LAMP) + CEP12* e la coppia di sonde *XL ATM+TP53*. In tal modo, per le sonde testate insieme, in un unico esperimento di ibridizzazione, è stato possibile definire con certezza due cloni citogenetici differenti, e nel momento in cui un clone mostrava entrambe le anomalie, ovvero la del(13q) insieme alla trisomia 12 oppure la del(17p) insieme alla del(11q), era possibile anche identificare l'origine del subclone in questione (Fig. 34a-34b).



Figura 34. Composizione clonale eseguita mediante sonde testate nello stesso esperimento di ibridizzazione. (a) Mix di sonde: del(13q)(DLEU/LAMP) + CEP12 rivelano tre distinti pattern di ibridizzazione che consentono di distinguere tra biclonalità (clone 1 e clone 2) e subclonalità (clone 2 ha dato origine al clone 2a). (b) Mix di sonde XL ATM+TP53 rivelano due distinti pattern e quindi biclonalità (clone 1 e clone 2). Segnale verde indica cromosoma 12 e del(11q), segnale rosso indica del(13q) e del(17p).

La difficoltà nel definire la composizione clonale, riguardava i casi in cui l'analisi FISH mostrava la presenza di due anomalie rinvenute mediante due sonde non testate insieme [ad es. del(13q) e del(11q) o trisomia 12 e del(17p)]. Abbiamo dunque stabilito un *cut off* del 30% per discriminare tra “major clone” e “minor clone”, definendo major clone quello con la percentuale massima di cellule coinvolte se la discrepanza tra le due aberrazioni era maggiore del 30%, mentre il minor clone quello con la percentuale minima (Fig 35a). Abbiamo considerato, invece, una situazione di monoclonalità il rinvenimento di due cloni di taglia simile (differenza nella taglia <30%), considerando dunque le due anomalie emerse facenti parte dello stesso clone (Fig. 35b).

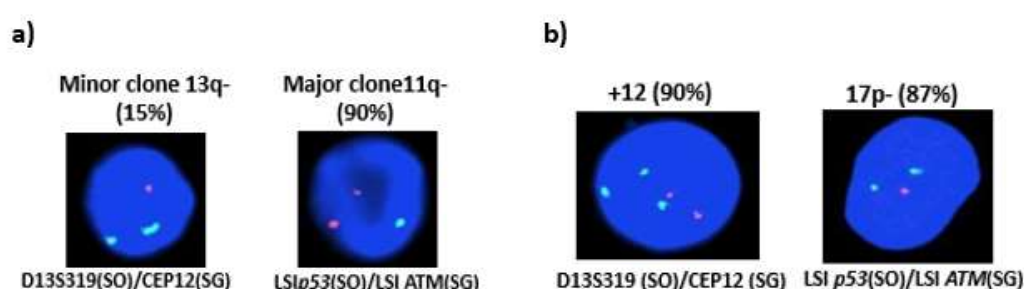


Figura 35: Composizione FISH eseguita mediante sonde non ibridate nello stesso esperimento. (a) Evidenza di bicolonialità (discrepanza >30%) in cui i *pattern* di ibridazione sono: per il minor clone (15%) 2G1O, indice di del(13q) e per il major clone (90%) 1G2O, indice di del(ATM). **(b)** Chiara evidenza di monoclonalità (discrepanza tra le due sonde non testate insieme <30%) in cui i *pattern* di ibridazione sono: 3G2O (90%) che rileva la trisomia 12 e 2G1O che rileva del(p53) (87%). Segnale verde indica cromosoma 12 e del(11q) mentre il segnale rosso indica del(13q) e del(17p).

Il valore di *cut off* è stato stabilito in base all'evidenza che la discrepanza tra i risultati ottenuti da due operatori diversi nel nostro laboratorio non era mai maggiore del 30%. Considerando tali premesse, è stato possibile distinguere nella nostra casistica: pazienti monoclonali con una sola anomalia (40%), pazienti monoclonali con la simultanea presenza di due o più anomalie (7%), pazienti con più cloni coesistenti (36%), pazienti senza anomalie in FISH (17%).

4.2.2 Risultati: Validazione del nuovo modello prognostico

Per la validazione del nuovo modello prognostico, è stata eseguita un'attenta analisi statistica, mediante il confronto delle curve di sopravvivenza (OS) ed il TTFT tra:

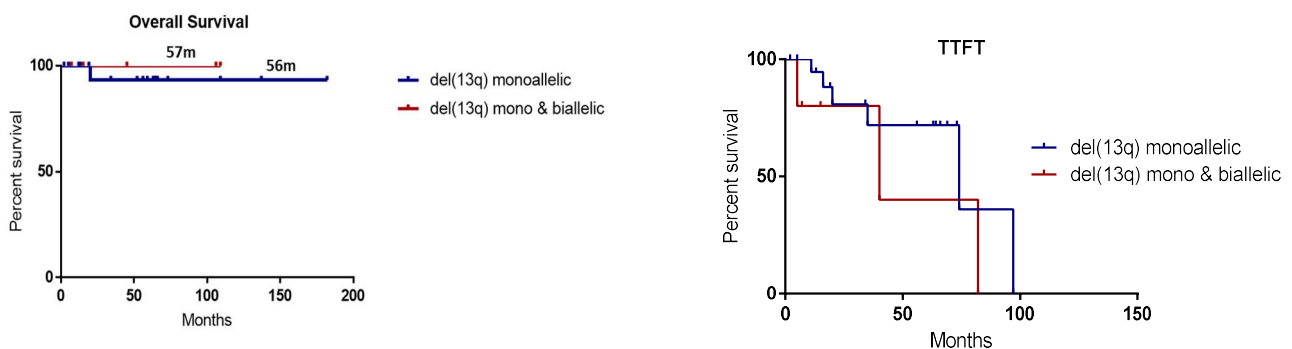
1. pazienti con la sola del(13q) monoallelica e pazienti con la copresenza di del(13q) mono e biallelica (Fig. 36a)
2. pazienti FISH negativi e gruppo favorevole [quindi con del(13q)] (Fig. 36b)

3. pazienti con *minor unfavorable clone* [del(17p) o del(11q)] sia con la classe prognostica sfavorevole, sia con la classe prognostica favorevole (Fig. 36c-36d)

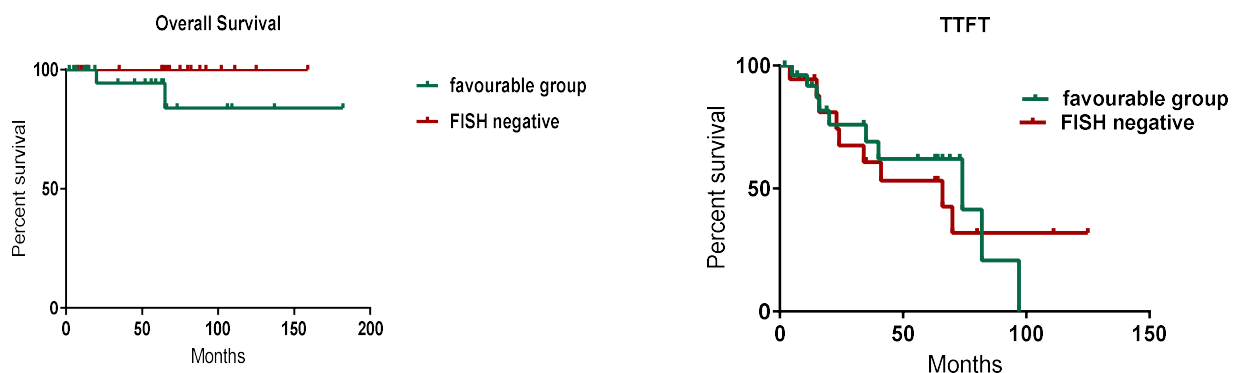
Non è stata osservata nessuna differenza statistica, sia in termini di OS che di TTFT, tra pazienti con del(13q) monoallelica e pazienti con del(13q) biallelica, così come tra il gruppo di rischio favorevole e pazienti con FISH negativa. Per tale ragione pazienti con del(13q) mono- e bi- allelica e con FISH negativa sono stati inclusi nella classe di rischio favorevole (Fig. 36a e 36b).

E' emersa, invece, una differenza statisticamente significativa nel TTFT ($p=0,0254$) tra il gruppo con *minor unfavorable clone* ed i pazienti della classe di rischio sfavorevole (Fig. 36c). Inoltre, i pazienti con *minor unfavorable clone* non solo mostravano una mediana di OS più lunga rispetto al gruppo ad alto rischio (88 vs 69 mesi) (Fig. 35c) ma erano anche caratterizzati da un minor numero di casi trattati (41% vs 72%). Tali evidenze dimostravano una differenza sostanziale tra i due gruppi. Ulteriore conferma di tale dato è emersa dal confronto tra il gruppo con *minor unfavorable clone* e il gruppo di rischio favorevole, in cui l'OS e TTFT non mostravano differenza statisticamente significativa (Fig. 36d). Pertanto anche pazienti con anomalie ad alto rischio, presenti come *minor clone*, sono stati inclusi nella classe di rischio favorevole.

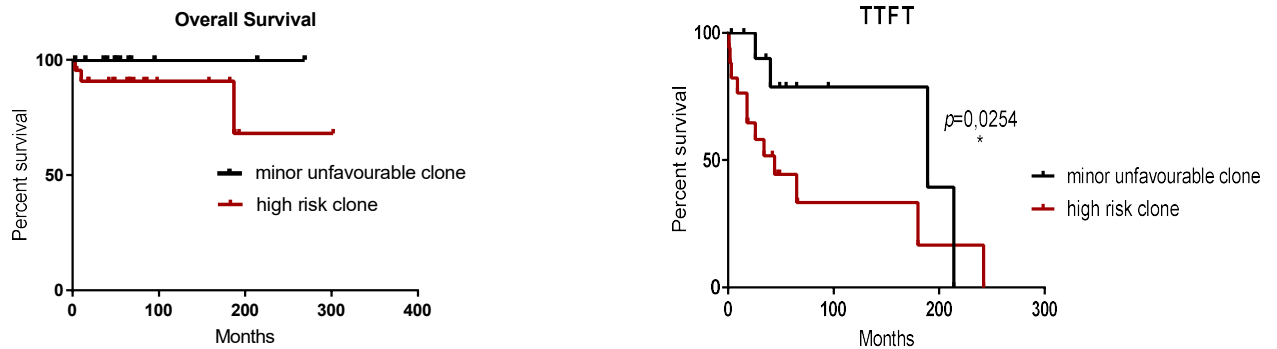
a)



b)



c)



d)

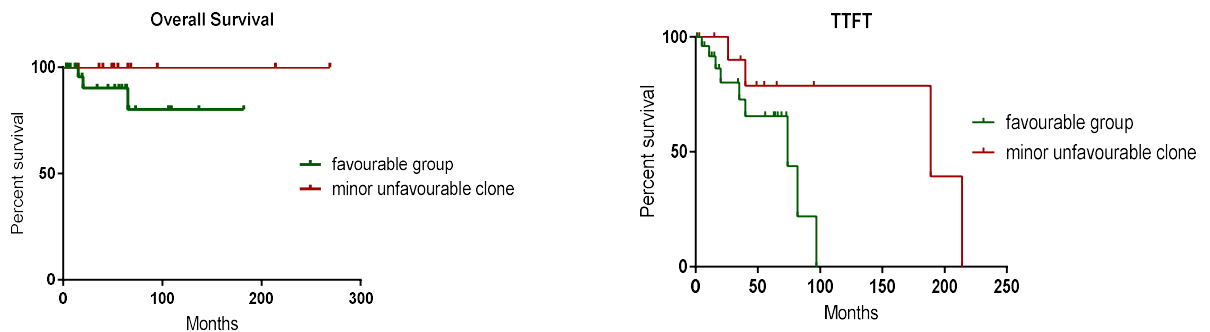


Figura 36: Analisi statistica dell'OS e TTFT. (a) confronto tra del(13q) monoallelica e del(13q) mono e biallelica; **(b)** confronto tra gruppo di rischio favorevole e pazienti FISH negativi; **(c)** confronto tra minor unfavourable clone e gruppo di rischio sfavorevole; **(d)** confronto tra minor unfavourable clone e gruppo di rischio favorevole

Alla luce di tali considerazioni i pazienti sono stati stratificati sia secondo l'algoritmo convenzionale sia secondo il nuovo modello. Nello specifico il 13% dei pazienti (n=14) è stato ristrutturato, e come si evince anche dall'istogramma di Figura 37, era evidente nel nuovo modello una riduzione del numero di pazienti della classe di rischio sfavorevole e conseguente incremento della classe di rischio favorevole.

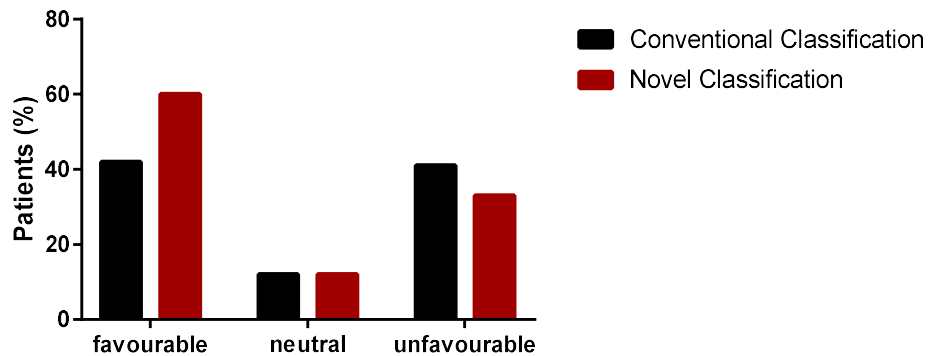


Figura 37 Confronto tra il modello convenzionale, ed il nuovo algoritmo. Numero dei pazienti nel gruppo favorevole convenzionale vs nuovo: 47 vs 60; Numero dei pazienti nel gruppo intermedio convenzionale vs nuovo: 11 vs 12; Numero dei pazienti nel gruppo sfavorevole convenzionale vs nuovo: 47 vs 33

Sorprendentemente l'OS del modello convenzionale non ha raggiunto la significatività statistica, contrariamente al nuovo modello che mostrava una maggiore potenzialità nel discriminare i pazienti nelle tre classi di rischio, sia per l'OS ($p=0,0318$) e, soprattutto, per il TTFT ($p=0,005$) (Fig. 38).

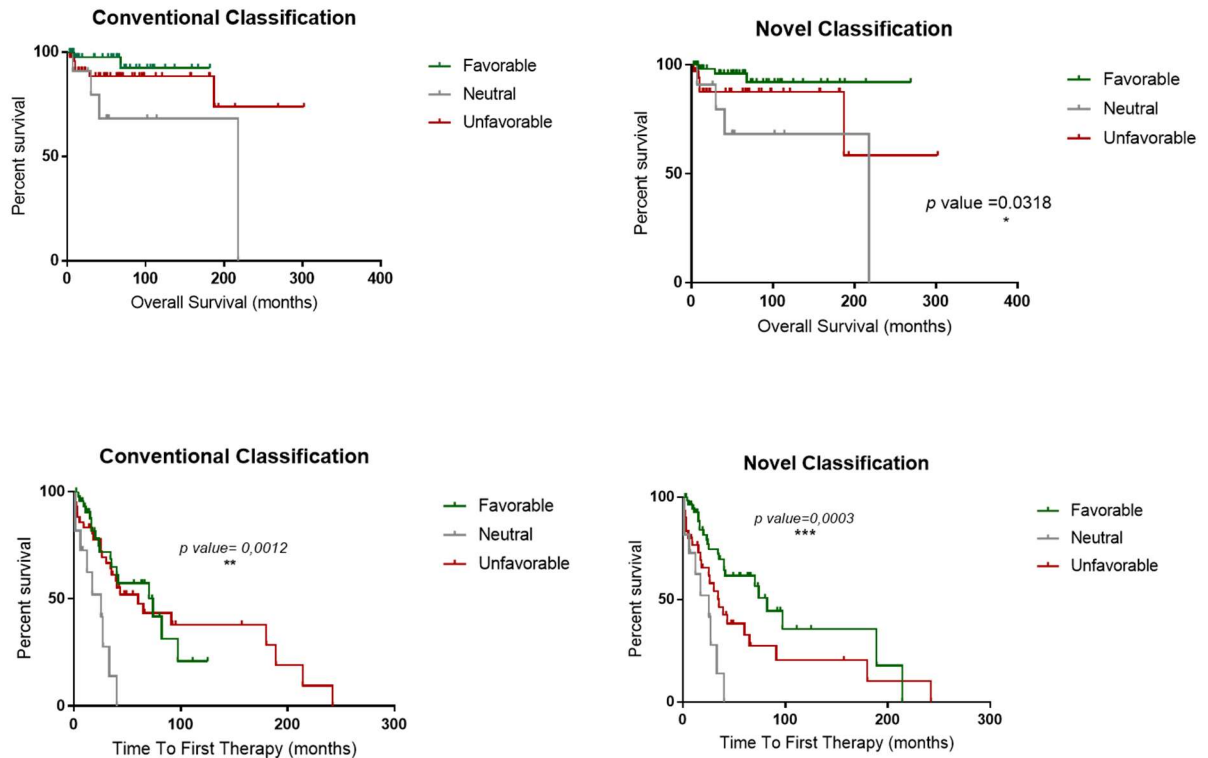


Figura 38: I grafici mostrano le curve di sopravvivenza calcolate per l'OS (in alto) e per il TTFT (in basso) nei tre gruppi citogenetici prognostici sia del modello convenzionale sia del nuovo modello.

4.2.3 Risultati studio longitudinale

Per i 52 pazienti nei quali è stato possibile eseguire lo studio longitudinale è emerso che il 48% (25/52) di essi andava incontro ad evoluzione clonale, definita come l'insorgenza di nuove anomalie citogenetiche nel clone primario e/o la comparsa di nuovi cloni citogenetici. L'anomalia maggiormente acquisita, durante l'evoluzione clonale, era la del(17p12), rilevata nel 25% dei casi, ovvero in 13 su 52 pazienti, in 11 dei quali compariva come piccolo clone di taglia inferiore al 20%, mentre nei rimanenti due pazienti è stata rinvenuta rispettivamente nel 50% e nel 54% dei nuclei in associazione ad un cariotipo complesso. La monosomia 12 è risultata la seconda anomalia maggiormente rilevata al *follow up* (17% dei casi, ovvero in 9 pazienti con TPCM del 14%) seguita dalla del(13q) monoallelica (15% dei casi, n=8 con TPCM del 22%),

dalla del(11q22) (7,6% dei casi, n=4 con TPCM del 13,5%), dalla trisomia 12 (5,7% dei casi, n=3, con TPCM del 30%) e dalla del(13q) biallelica (5,7% dei casi, n=3, con TPCM del 9%) (Fig. 39). Inoltre nel 3,8% dei casi è emersa una condizione di tetraploidia.

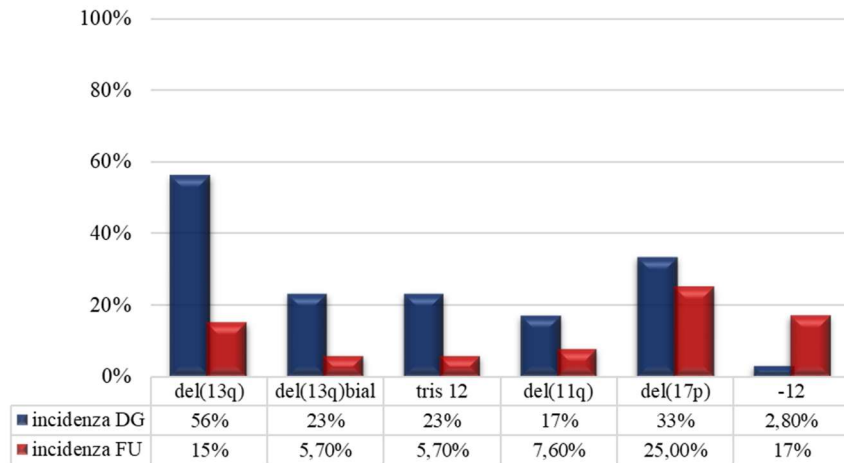


Figura 39. Istogramma in cui sono rappresentate l'incidenza delle anomalie alla diagnosi (DG) calcolato per la casistica generale (105 pazienti) ed acquisite durante il *follow up* (FU), calcolate per i 52 pazienti dello studio longitudinale.

Al *timepoint 1*, il 44% dei pazienti mostrava una condizione di monoclonalità, nello specifico il 32% (n=17) presentava una sola anomalia mentre il 12% (n=6) mostrava la simultanea presenza di due o più anomalie, il 37% (n=19) presentava una condizione di ITH ed il 19% (n=10) nessuna aberrazione in FISH. L'evoluzione è stata rinvenuta sia nei pazienti trattati (n=40) sia in pazienti non trattati (n=12) a livello di tutti i sottogruppi clonali (Fig. 40). In particolare, i pazienti con una condizione di ITH alla diagnosi hanno mostrato la minore incidenza di evoluzione clonale (15%).

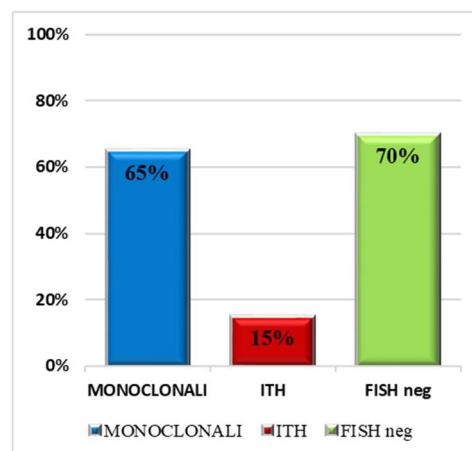


Figura 40. Istogramma delle incidenze di CE nei tre gruppi con diversa composizione clonale: CE in 15/23 (65%) pazienti monoclonali; CE 3/19 (15%) pazienti con ITH; CE in 7/10 (70%) pazienti con nessuna anomalia alla diagnosi (FISH negativa).

Lo studio di composizione clonale mediante FISH ha anche consentito di definire il tipo di dinamica evolutiva, ovvero branching o lineare, spesso evidente già al *timepoint 1* nei pazienti ITH (Fig. 41)

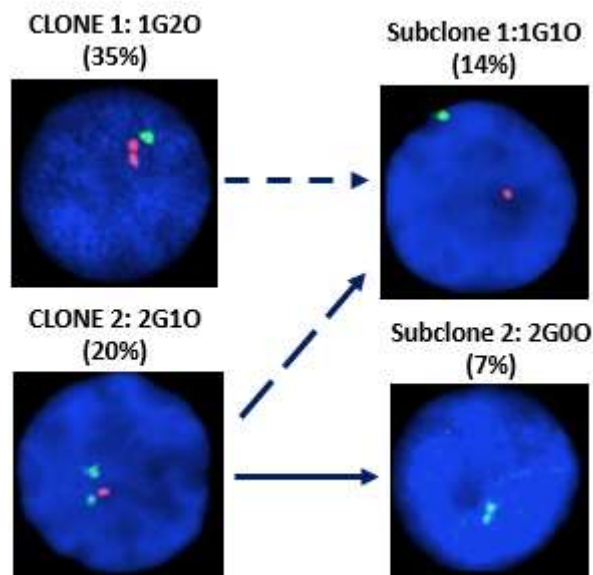


Figura 41. Composizione FISH mediante set probe XL 11q/ATM (SO)/ 17p/p53 (SG). Presenza di evoluzione clonale secondo il modello “clonal branching” che ha dato origine a due cloni non correlati citogeneticamente, CLONE 1 con il pattern di ibridazione 1G2O (35%), ovvero con del(11q), ed il CLONE 2 con pattern di ibridazione 2G1O (20%), ovvero con del(17p). Mediante modalità di evoluzione lineare sono stati originati due subcloni. In particolare, mentre per il subclone 2 (pattern 2G0O) è possibile definire con certezza l’origine dal CLONE 2 (freccie continue), per il subclone 1 (con pattern 1G1O) non è possibile definire con esattezza la sua origine, in quanto potrebbe derivare sia dal CLONE 1, sia dal CLONE 2 (freccie tratteggiate).

Bisogna sottolineare che oltre all’evoluzione clonale (intesa come acquisizione di nuove anomalie al *follow up*), dallo studio longitudinale sono emerse altre quattro distinte condizioni:

- STABILITA’ CLONALE (CS, Clonal Stability):** nessuna variazione nel numero e nella taglia dei cloni nei successivi *follow up*.
- RIDUZIONE e/o ERADICAZIONE del clone (CSR, Clonal Size Reduction):** i cloni sono ridotti o completamente eradicati dall’intervento terapeutico.
- EQUILIBRIO CLONALE (E, Clonal Equilibrium):** le proporzioni dei cloni rimangono costanti sia in caso di aumento che di diminuzione della taglia del clone. Nessun clone prende il sopravvento sull’altro. Condizione osservata solo nei pazienti con ITH non trattati.
- SBILANCIAMENTO CLONALE (CI, Clonal Imbalance):** le proporzioni baseline dei cloni variano nei successivi *follow up*, con il sopravvento del clone *fitter* sulla popolazione.

Complessivamente, i risultati dello studio longitudinale, sono riassunti nello schema in Figura 42.

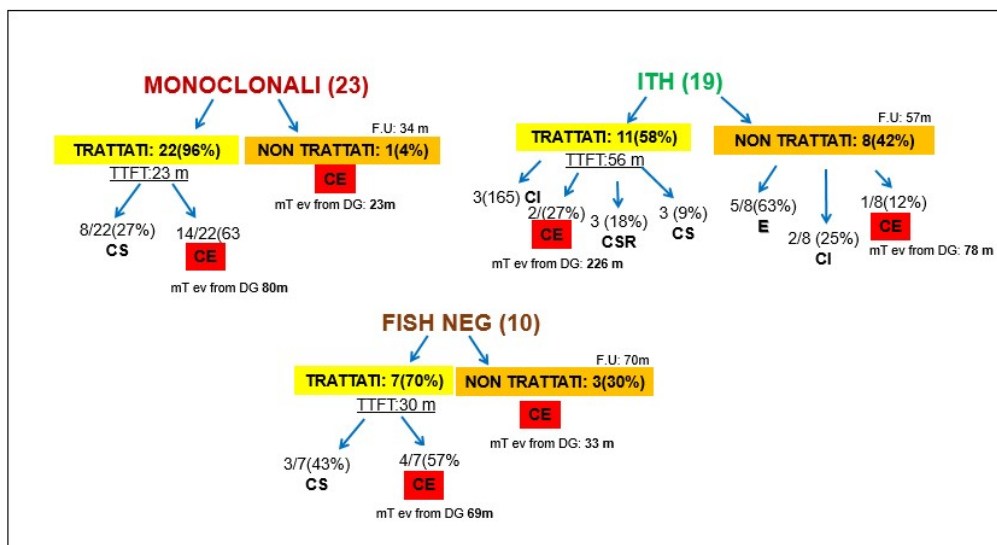


Figura 42: Gli schemi riassumono i risultati dello studio longitudinale. *Abbrev:* TTFT, Time To First Treatment, F.U.: follow up. CS: Stabilità clonale (Clonal Stability); CE: Evoluzione Clonale (Clonal Evolution); CI: Sbilanciamento Clonale (Clonal Imbalance); CSR: Riduzione della taglia del clone (Clonal Size Reduction); E: Equilibrio Clonale (Clonal Equilibrium); mT ev from DG: tempo medio calcolato dalla diagnosi all’evoluzione.

Nello specifico, la stabilità clonale è stata osservata solo nei pazienti trattati ed in tutte e tre le classi clonali, ovvero sia nei monoclonali (n=8) sia nei FISH negativi (n=3) e sia negli ITH (n=3). E’ una condizione associata a refrattarietà al trattamento terapeutico e ad evoluzione clinica. Solo il 28,5% dei pazienti (4/14) in stabilità clonale presentavano anche una condizione di stabilità clinica (2 pazienti con ITH e 2 pazienti con FISH negativa).

La maggior parte dei pazienti monoclonali sono andati incontro ad evoluzione clonale (15/23). Essi sono tutti pazienti sottoposti a più linee di terapia in cui l’evoluzione clonale era sempre associata a progressione della malattia, ad eccezione dell’unico caso evoluto ma che non ha necessitato del trattamento durante il *follow up* considerato.

Dei pazienti FISH negativi (17%) solo tre sono rimasti in una condizione di stabilità clonale, i rimanenti, sia trattati che non trattati, sono andati incontro ad evoluzione, e nei pazienti trattati il processo evolutivo era associato a progressione della malattia.

Nel sottogruppo dei pazienti con ITH è emerso una condizione di equilibrio clonale esclusivamente tra i pazienti non trattati (ovvero nel 62,5% degli ITH non trattati). Tale condizione era associata a stabilità clinica nonostante la presenza di cloni con anomalie ad alto rischio, ed in un caso anche in presenza di cariotipo complesso (Tab. 15). Inoltre tra gli ITH non trattati è emerso un solo caso di evoluzione clonale, tuttavia, senza associazione a progressione clinica. Negli altri due casi è stata, invece, osservata una condizione di sbilanciamento clonale con un aumento della taglia dei cloni *fitter* (selezione clonale). Sebbene tale dinamica evolutiva potrebbe essere indice di inizio del processo di evoluzione clonale, in entrambi i casi era corrispondente ad una situazione di stabilità clinica.

PAZIENTI ITH NON TRATTATI						
Pazienti (F.U.)	T ₁ FISH	T ₂ Cariotipo	T ₂ FISH	T ₂ Cariotipo	T ₁ → T ₂ (mesi)	Dinamica clonale
#1 66m	del(13q): 56% del(17p):8%	Nd	del(13q): 62% del(17p):5%	nd	64	E
#2 47m	del(13q): 19% del(ATM): 87%	46,XY[3]/47,XY,del(3q),der(11)t(11;?)(q?:?),add(13p),+14[7]/47,XY,idem,del(2q),del(3q)[8]	del(13q): 23% del(ATM): 95%	46,XY[3]/47,XY,der(11)t(11;?)(q?:?),del(3q)add(13p),+14,del(3q)[13]	32	E
#3 36m	del(13q): 51% del(17p):15%	nd	del(13q): 36% del(17p):9,5%	nd	20	E
#4 40m	del(13q): 95% del(17p):12%	nd	del(13q): 100% del(17p):5%	nd	28	E
#5 15m	Tris12: 48% Tis12+del(13q): 10% Del(13q): 12% Del(17p):8%	nd	Tris12: 57% Tis12+del(13q): 8% Del(13q): 16% Del(17p):7%	nd	13	E
#6 55m	del(13q)mon: 45% del(13q)bial: 40% del(17p): 9,5%	nd	del(13q)mon: 18% del(13q)bial: 77% del(17p): 28%	nd	34	CI
#7 157m	del(ATM): 48% Del(13q):9% Tris12:7% Del(13q)+tris12:6% -12: 6% IgH del: 70%	nd	del(ATM): 75% Tris12:8% Del(13q): 3% -12: 4%	nd	20	CI
#8 42m	Del(ATM): 35% Del(ATM)+del(17p):14% Del(17p):20% delATM+del17pbial:7% Del(17p)tot: 41%	46,XX[15]/46,XX,ring(15?)[4]/45,X,-X,t(1;19)(q?:p?),+der(19)t(1;19),-20[1]	Del(13q): 8% Del(ATM): 5% Del(17p):5,5%	46,XX,ring(15)[16],91,XXXX,+ring(15)[6]	42	CE

Tabella 15. In tabella sono riportati i risultati FISH e di Citogenetica Convenzionale al T₁ e al T₂ dei pazienti ITH. Per ciascun paziente è riportato il *follow up* ed il tempo osservazionale calcolato tra la prima analisi citogenetica (T₁) e l'ultima analisi eseguita (T₂). *Abbrev.* F.U.: *follow up*. CE: Evoluzione Clonale (Clonal Evolution); CI: Sbilanciamento Clonale (Clonal Imbalance); E: Equilibrio Clonale (Clonal Equilibrium).

Per quel che riguarda il sottogruppo di pazienti con ITH trattati, sono emerse tutte le condizioni di dinamica evolutiva (Fig. 42): due casi con evoluzione clonale corrispondente a progressione clinica e mancata

risposta alla terapia; tre casi con stabilità clonale, in un caso associata a progressione di malattia mentre negli altri due casi a risposta al trattamento e stabilità clinica; tre casi con una condizione di riduzione della taglia del clone associata a risposta alla chemio-immunoterapia. Infine negli ultimi tre casi è stata osservata una condizione di sbilanciamento clonale dovuta al trattamento terapeutico, in particolare la chemio-immunoterapia ha determinato la riduzione solo dei cloni con anomalie favorevoli, selezionando cloni *fitter*. In tutti i casi tale condizione era associata ad una mancata o parziale risposta al trattamento.

E' stata valutata anche l'evoluzione clonale in base al tipo di terapia: chemio-immunoterapia vs *targeted therapy*. Dei 40 pazienti trattati il 50% è andato incontro a CE (20/40). I pazienti trattati ed evoluti presentavano un TTFT significativamente più breve rispetto ai pazienti trattati e non evoluti ($p < 0,0001$).

E' emerso che tutti i pazienti trattati ed evoluti, sono stati sottoposti ad almeno una linea di chemio-immunoterapia e nel 60% dei casi (12/20) è comparso un clone con anomalie ad alto rischio, prevalentemente con del(17p). Tuttavia poiché cloni con del(17p) sono emersi anche in pazienti non trattati sembrerebbe essere un'anomalia terapia indipendente. Quasi tutti i pazienti (80%) hanno richiesto più linee di terapia, solo 4/20 hanno mostrato una riduzione della taglia dei cloni dopo la prima linea di chemio-immunoterapia con corrispondente stabilità clinica, eccetto per un paziente successivamente deceduto. I pazienti non responsivi a più linee di terapia, sono stati sottoposti a trattamento con i novel agent (Ibrutinib, Idelalisib e Venetoclax). Nella maggior parte dei casi il trattamento con tale strategia terapeutica o ha determinato riduzione dei cloni oppure ha mantenuto una condizione di equilibrio clonale evitando l'espansione del clone *fitter*. Tuttavia, sono stati osservati anche casi in cui post trattamento con novel agent sono emersi nuovi cloni: due casi con comparsa di monosomia 12, un caso con comparsa di del(17p).

5.DISCUSSIONE

5.1 PROGETTO 1

Gli studi eseguiti mediante array-based comparative hybridization (aCGH) e più recentemente mediante sequenziamento massivo di nuova generazione hanno fornito informazioni aggiuntive sull'intero genoma della LLC identificando delezioni, amplificazioni ed eventi mutazionali (es. in *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* e *BIRC3*) con una probabile rilevanza prognostica. Tali ricerche hanno dimostrato che la complessità genomica dei pazienti affetti da LLC è molto più ampia di quanto ritenuto per anni (Malek et al., *Oncogene* 2013). Inoltre i recenti studi mediante combinazione di aCGH e di SNP array hanno anche dimostrato la presenza di CN-LOH, anomalia per anni sottostimata perché non individuabile dagli attuali approcci diagnostici (Edelmann et al, *Lymphoid Neoplasia* 2011). Già ben dieci anni fa Gunn *et al.* hanno dimostrato l'alta frequenza di anomalie addizionali nei pazienti con LLC, concludendo che la complessità genomica era l'anomalia più frequente dopo la del(13q). Gli stessi autori sottolineavano l'importanza di introdurre nella routine clinica una metodica, come gli aCGH, in grado di fornire una visione *genome wide* e risultati affidabili e riproducibili che potessero essere d'aiuto nel *setting* diagnostico dei pazienti affetti da LLC (Gunn et al., *J Mol Diagn.*2008)

Ad oggi le più comuni tecniche di citogenetica usate per l'analisi delle anomalie ricorrenti della LLC sono la FISH e la citogenetica convenzionale. Entrambe presentano importanti limitazioni. La FISH, seppure è una metodica ad alta sensibilità in grado di rilevare anomalie anche in una bassa percentuale di cloni anomali (<5%), è fortemente limitata dall'essere una tecnica *targeted* che fornisce, quindi, informazioni solo dei *loci* interrogati dalle sonde usate durante l'esperimento. Contrariamente, la citogenetica convenzionale fornisce informazioni sull'intero assetto cromosomico ma con una bassa risoluzione. Difatti l'anomalia più frequentemente individuata mediante FISH, ovvero la del(13q14) rinvenuta nel 50% dei pazienti alla diagnosi è, invece, rilevata solo nel 8-10% dei casi mediante bandeggio cromosomico, essendo spesso un'anomalia submicroscopica. Inoltre, entrambe le metodiche sono limitate dalla soggettività nell'interpretazione dei risultati (Grygalewicz B. et al., *Mol Cytog.* 2016).

Dunque alla luce di tali limitazioni e considerando che la LLC non è caratterizzata solo da anomalie a livello dei quattro loci routinariamente scrinati, la sola analisi mediante FISH e citogenetica convenzionale potrebbe essere poco efficace nel definire la complessità genomica della LLC. Per tale ragione, abbiamo provveduto ad eseguire un'analisi preliminare su 10 pazienti, confrontando le *performance* della FISH rispetto a tre metodiche di citogenetica molecolare più sofisticate: MLPA, aCGH + SNP array (Cytosure Haematological Cancer, 8x 60k) ed una nuova piattaforma di cariotipizzazione basata sulla tecnologia NGS (Illumina) a basso *coverage* (0,17x). E' stato confrontato il tasso di anomalie rilevate dal pannello FISH

standard con quello ottenute dalle altre piattaforme. Il fine ultimo era quello di individuare quale approccio metodologico potesse essere in grado di sostituire, o eventualmente affiancare, la FISH e la citogenetica convenzionale nell'analisi di *routine* clinica di pazienti affetti da LLC. Sono stati, pertanto, valutati i punti di forza e gli eventuali svantaggi di ciascuna metodica. Tale lavoro è stato eseguito in collaborazione con il centro di Genetica Umana dell'Università di Leuven (BE).

I 10 pazienti sottoposti all'analisi (6 nuove diagnosi e 4 rivalutazioni) sono stati selezionati in base alla distribuzione delle lesioni citogenetiche rinvenute mediante FISH e cariotipizzazione convenzionale, prediligendo campioni caratterizzati da sbilanciamenti cromosomici piuttosto che da traslocazioni. Dalla nostra analisi è emerso che il maggior numero di anomalie è stato rilevato dalla piattaforma di aCGH + SNP array e dalla LPS (24/28 per aCGH, 24/28 per LPS vs 17/28 FISH).

Il confronto tra le anomalie rinvenute mediante bandeggio cromosomico e FISH ha dimostrato una forte complementarità tra le due metodiche. Difatti solo in un caso è stata osservata una completa discrepanza tra i risultati FISH e bandeggio cromosomico (in CLL3). Emerge, quindi, quanto questi due approcci diagnostici siano sinergici, ovvero cooperino, nel definire in modo più accurato e completo le anomalie citogenetiche di ciascun paziente.

La MLPA è risultata essere uno strumento poco efficace a causa della sua bassa sensibilità. Difatti in accordo con la letteratura (Fabbris et al., *Genes Chrom. Cancer*. 2011) solo se la taglia del clone era > del 40% l'analisi forniva un risultato affidabile. Risultati discordanti rispetto a quelli rinvenuti in FISH sono stati osservati in 5 su 10 pazienti. In tutti i casi la percentuale dei cloni (*range* tra 5-23%) era al disotto del *cut off* di sensibilità stimato per la MLPA. Dunque nonostante gli evidenti vantaggi di tale approccio metodologico, sia in termini economici che tecnici (metodica semplice che non richiede un'attrezzatura troppo elaborata ed in grado di fornire risultati in 24 ore), dalla nostra indagine emerge che la MLPA non è un valido strumento per soppiantare o affiancare la FISH nel *management* di campioni di LLC.

Poiché le anomalie prognosticamente rilevanti nella LLC sono rappresentate da sbilanciamenti piuttosto che traslocazioni, risulta una neoplasia ideale per essere analizzata mediante tecniche di microarray. Difatti diversi gruppi hanno provveduto ad analizzare campioni di LLC mediante le varie piattaforme di aCGH e SNP array disponibili in commercio con lo scopo di valutare l'eventuale introduzione di questi strumenti nella routine clinica. Dalla letteratura emerge che gli aCGH e soprattutto gli SNP array possono rappresentare una valida alternativa alla FISH per il rilevamento delle anomalie citogenetiche nei pazienti affetti da LLC (Kay NE et al., *Cancer Genet Cytogenet* 2010) (XU et al., *Cancer Genet*. 2013) (O' Malley et al., *Int J Lab Hematol* 2010).

I risultati del presente lavoro hanno dimostrato che gli aCGH e LPS mostravano un'alta specificità per i quattro *loci* rutinariamente scrinati, e contrariamente alla MLPA, fornivano una più accurata analisi del cariotipo molecolare dei pazienti analizzati. Difatti il confronto del tasso di anomalie rilevate da aCGH e LPS vs FISH, ha dimostrato che tali metodiche sono state in grado di rilevare in quasi tutti i casi le quattro

anomalie ricorrenti investigate dal pannello FISH. Il grado di concordanza tra aCGH vs FISH e LPS vs FISH, era piuttosto alto ($k = 0,875$ per aCGH; $k=0,785$ per LPS). In particolare mentre la LPS ha mostrato risultati discordanti in 3 pazienti, l'analisi mediante aCGH ha fornito un solo risultato discordante rispetto alla FISH. Infatti nel paziente CLL5 solo l'analisi FISH è stata in grado di rilevare un piccolo clone (11%) con del(13)(q14). Tutti i risultati discordanti erano dovuti alla bassa sensibilità delle due metodiche. In linea con la letteratura, per gli aCGH è emerso che il *cut off* di sensibilità era del 25% di cellule anomale rinvenute in FISH. E' opportuno sottolineare che già in presenza di cloni con una taglia del 30% tale metodica forniva risultati di difficile interpretazione che necessitavano di essere confermati con altri metodi. Tale risultato è pienamente concorde con i dati della letteratura (Ouillet et al., *Blood* 2011; Mian et al. *Ann Oncol*, 2013; Patel A. et al., *AM J Haematol* 2008). Difatti, i risultati di un importante lavoro eseguita da Ouillet et al nel 2011, in cui venivano valutati i profili di CNV mediante SNP array (SNP 6.0 Affymetrix) di una casistica di 255 pazienti, ha mostrato che la sensibilità e la specificità di tale metodica, riguardo alle quattro anomalie LLC ricorrenti rilevate mediante FISH, era piuttosto alta solo per anomalie rinvenute in FISH in una percentuale $\geq 25\%$ dei nuclei (Ouillet et al. *Blood* 2011). Questo risultato dimostra l'impossibilità di sostituire completamente la FISH nella routine clinica poiché essa rimane la tecnica con più alta sensibilità. Bisogna però anche sottolineare che in alcuni lavori sono riportati valori di *cut off* più bassi rispetto a quanto appena affermato. Difatti in un studio eseguito su 28 campioni di sangue periferico di pazienti affetti da LLC, senza preliminare purificazione delle cellule CD19⁺, è stato dimostrato che le piattaforme più moderne, quali CytoScan HD Array (Affymetrix) e HumanOmniExpress Array (Illumina), erano in grado di rilevare CNV anche in presenza di percentuali inferiori al 16% di cellule anomale individuate dalla FISH (Stevens-Kroef et al., *Mol Cytogenet.* 2014). Un risultato simile è emerso anche dallo studio di Schultz et al., eseguito su 25 pazienti mediante una piattaforma aCGH con sonde BAC. Gli autori hanno dimostrato che tale piattaforma era in grado di rilevare anomalie anche in pazienti con il 10% di cellule anomale (Shultz et al., *Mol Cytogenet.* 2011).

L'importanza di un'analisi *genome wide* nella routine clinica emerge dal lavoro di Kei et al. Essi, infatti, hanno dimostrato che il numero di CNV e la dimensione delle anomalie (>66 Mb) era associata a progressione di malattia (PFS) (Kay et al *Cancer Genet Cytogenet.* 2010). Più recentemente anche il lavoro di Mian e collaboratori ha rilevato che la presenza di almeno un'anomalia con dimensione maggiore di 5 Mb, anche in assenza di mutazione di *TP53*, è associata ad un minore OS e TTFT anche nei pazienti con *IgHV* mutato (Mian et al., *Annals of Oncology* 2013).

Per integrare gli aCGH nella routine clinica come uno strumento *first-line* potrebbe essere utile l'algoritmo proposto da Gun et al., secondo cui, nei casi con meno del 30% delle cellule leucemiche bisognerebbe procedere con una fase di purificazione delle cellule B mediante citofluorimetria a flusso (Gun et al., *J Mol Diagn.* 2008). Comunque, è sempre opportuno usare nella pratica clinica metodiche ad alta sensibilità soprattutto durante le rivalutazioni di malattia poiché, spesso, durante l'evoluzione clonale le lesioni genetiche compaiono solo in piccoli subcloni (Gunnarson R. et al., *Haematologica* 2010).

Rispetto agli aCGH, la metodica di cariotipizzazione molecolare NGS-based è risultata invece molto sensibile, seppure in 3 pazienti non è stata in grado di rilevare l'anomalia rinvenuta in FISH. Ciò potrebbe essere dovuto al diverso materiale biologico usato nelle due analisi, ovvero DNA purificato per la LPS e sangue periferico intero per la FISH. La LPS è stata in grado di fornire un risultato chiaro anche in casi con una percentuale di cellule leucemiche inferiore al 16%. Difatti gli esperimenti di diluzioni seriali hanno dimostrato che già in presenza di una percentuale di cellule del 5% erano evidenti oscillazioni dallo zero nel grafico del profilo dei CNV. Data la notevole sensibilità, il *cut off* utilizzato per discriminare tra *gain* e *loss* (amplificazioni e delezioni) inizialmente settato a $\log_2 + 0,36$ per i *gain* e $-0,36$ per i *loss* è stato ridotto a $+0,1375$ per *gain* e $-0,152$ per *loss*. Inoltre, in caso di una bassa percentuale di cellule anomale, tra il 5-20%, il *cut off* è stato posto a $-0,03653$ per le *loss* e $+0,035624$ per i *gain*. In questi casi, in presenza di anomalie con significato prognostico certo risulta, tuttavia, necessario procedere con ulteriore conferma in FISH. Tale algoritmo consentirebbe di poter introdurre la LPS nella routine clinica, evitando la fase di selezione cellulare mediante la citofluorimetria a flusso, necessaria per gli aCGH, riducendo considerevolmente i costi.

Altro vantaggio della LPS è la possibilità di sequenziare contemporaneamente fino a 15 campioni consentendo ulteriormente di ridurre i costi rispetto all'analisi aCGH che, contrariamente, necessita sempre di essere eseguita in doppio (dye swap), risultando pertanto una metodica particolarmente costosa. Inoltre la LPS non solo mostra una maggiore risoluzione rispetto agli aCGH ma fornisce anche profili di CNV più chiari con un limitato "noise" (rumore) di sottofondo responsabile di una interpretazione difficoltosa dei risultati (Fig. 43). Tale vantaggio dipende sia dalla minore sensibilità della LPS alla qualità del DNA, riducendo artefatti tipici dei profili ottenuti da microarray (Scheinin I. et al., *Genome Research* 2014), ma anche dagli specifici algoritmi informatici utilizzati nella metodica LPS per ridurre il "noise" (rumore).

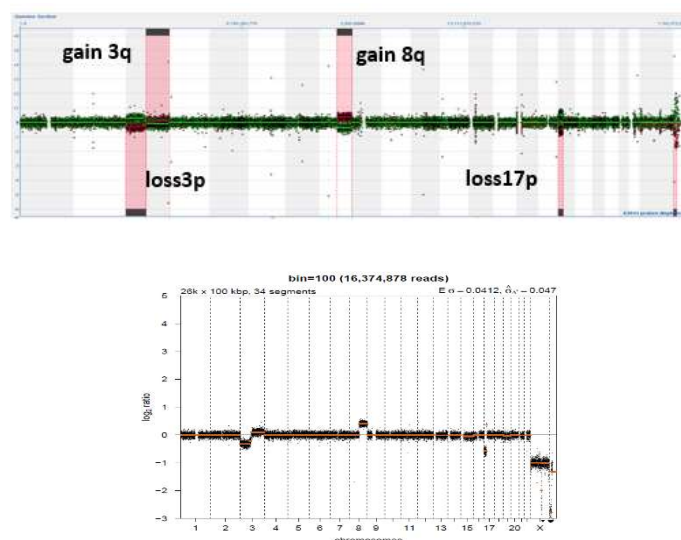


Figura 43. In alto: Profilo di CNV dell'intero cariotipo in cui è evidente un rumore di soffondo, dimostrato dalla presenza dei diversi punti (che rappresentano le sonde) non allineati allo zero. In basso: Il profilo di CNV ottenuto mediante LPS in cui è evidente un *pattern* più pulito.

A fronte di tali vantaggi bisogna però sottolineare che la LPS, al momento, non consente di definire regioni di CN-LOH, rilevabili invece mediante combinazioni di aCGH e SNP array. Tale anomalia sembrerebbe essere associata a prognosi infausta (Xu X. *Cancer Genet.* et al., 2013). Steven-Kroef et al hanno dimostrato non solo la presenza di CN-LOH a livello 13q14 e in 17p13 ma soprattutto hanno rilevato che i casi con CN-LOH in 17p13 erano associati a mutazioni di *TP53* in omozigosi (Kroef et al., *Mol Cytogenet* 2011). Inoltre in uno studio che comprendeva una casistica più ampia (369 pazienti con LLC alla diagnosi), eseguito mediante SNP array, è emersa la presenza di CN-LOH nel 3.5% dei pazienti ed in tutti i casi esaminati coinvolgeva sempre un'ampia regione a livello del 13q (Gunnarson et al., *Haematologica* 2011). Successivamente un recente lavoro ha dimostrato che la CN-LOH a livello del cromosoma 13 è un evento piuttosto frequente nella LLC spesso associato alla del(13q14) biallelica. Gli stessi autori hanno anche osservato che i pazienti con CN-LOH in 13q mostravano un'identica delezione su entrambi i cromosomi, ovvero con gli stessi *breakpoint*, indice del fatto che tali lesioni non poteva essere causate da due eventi sequenziali (Grygalewicz et al., *Mol Cytogenet* 2016). Il preciso significato patogenetico della CN-LOH non è ancora noto. Sembrerebbe essere associata ad evoluzione clonale poiché sembra essere un meccanismo mediante il quale vengono selezionati ed amplificati le anomalie che portano ad un vantaggio proliferativo del clone leucemico, favorendo in tal modo la sua espansione. Ad esempio Grygalewicz et al hanno osservato regioni di CN-LOH a livello 2q, in cui appariva mutato in omozigosi l'oncogene *REL* (Grygalewicz et al., *Mol Cytogenet* 2016). Tuttavia sebbene il significato prognostico della CN-LOH deve essere ancora confermato sembrerebbe essere un'anomalia non così rara nella LLC come invece precedentemente stimato (Edelmann et al., *Blood* 2011). Difatti anche nella nostra, seppure piccola casistica, sono state rilevate due regioni di CN-LOH, una a livello 11q14.3q22.3 ed una a livello 20q11.21q14. La CN-LOH in 20q risulta piuttosto rara nella LLC ma è stata già descritta in un recente lavoro (Pei et al., *Cancer Genet.* 2014). Anomalie a livello di questa nuova regione potrebbero avere un ruolo nella patogenesi della LLC ad oggi ancora sconosciuto.

Infine sia la LPS che gli aCGH hanno rilevato anomalie addizionali, in particolare: gain 8q coinvolgenti *MYC*, gain 4p, gain 7q, trisomia 19 e loss 3p, loss8p23, loss4p, loss18p loss20q. Delezioni a livello 3p e 18p sono state rilevate solo mediante LPS. Tutte le anomalie addizionali sono state confermate mediante FISH. In accordo con la letteratura anche nella nostra coorte è stata osservata l'associazione tra gain 8q e del(p53) (Rinaldi et al., *British Journal of Haematologi*, 2011). Un marker particolarmente importante da rilevare perché sembrerebbe essere associato non solo ad *outcome* sfavorevole ma anche a resistenza ad agenti alchilanti e alla fludarabina (Rinaldi et al., *British Journal of Haemat.* 2011). Nella nostra casistica abbiamo anche rivenuto in due pazienti un'ampia regione di delezione sul braccio corto del cromosoma 4 che seppure poco frequente è stata già descritta in letteratura (Gunnarson et al., *Haematologica* 2011). Comunque la bassa frequenza di tali anomalie rende difficile definire la minima regione deleta ed individuare eventuali geni correlati alla patogenesi della LLC.

Un altro vantaggio di tali metodiche è quello di definire la dimensione della delezione in 13q che varia da 300 kb a più di 70 Mb. Appare che i pazienti con delezione di tipo II (coinvolgente sia il locus *DLEU* che il gene *RBI*) hanno un *outcome* più sfavorevole rispetto a quelli con delezione di tipo I (Gunnarsson R. et al. *Haematol.* 2011). Difatti Klein et al., hanno dimostrato che topi ingegnerizzati con delezioni ampie sul 13q mostravano un fenotipo più aggressivo rispetto a quelli in cui era stata deleta solo la regione coinvolgente i mir-15a ed i mir-16-1, pertanto altri elementi genetici potrebbero essere coinvolti nel meccanismo patogenetico della LLC (Klein U et al., *Cancer Cell.* 2010). Nella nostra casistica, mediante FISH, abbiamo rinvenuto in 5/6 pazienti la del(13q) di tipo II, in due casi in mosaicismo, ovvero in presenza di un clone aggiuntivo con la del(13q) di tipo I. Sebbene nel presente lavoro non è stato possibile associare ai due tipi di delezione una specifica connotazione prognostica, tuttavia l'alta incidenza di del(13q) dimostra l'importanza di definire non solo la sua eventuale presenza/assenza ma anche la sua dimensione per il possibile risvolto prognostico.

Inoltre tali metodiche, essendo analisi *genome wide*, consentono di definire la complessità genomica. Nella nostra casistica le piattaforme di aCGH + SNP array e di LPS hanno dimostrato la presenza di cariotipo complesso (≥ 3 CNV) in ben 6 pazienti quasi sempre associato, ad eccezione di un caso, ad anomalie ad alto rischio, in accordo con i dati della letteratura (Steven-Kroef et al., *Molecular Cytogenetics* 2014).

Dunque dal nostro lavoro emerge che le anomalie addizionali sono piuttosto frequenti nei pazienti con LLC, tuttavia il significato prognostico di tali anomalie non è ben chiaro. Ad oggi affinché si possa procedere con una stratificazione del rischio più accurata è indispensabile definire l'eventuale ruolo prognostico di tali lesioni. In particolare, un recente lavoro ha dimostrato che l'applicazione degli SNP array consentirebbe una migliore definizione della prognosi nei pazienti con LLC senza alcuna anomalia in FISH. Tali pazienti considerati a prognosi favorevole secondo l'attuale modello prognostico sembrano, in realtà, essere caratterizzati da un breve TTFT (Mian et al., *Ann Oncol.* 2013).

Il concetto che le anomalie addizionali rinvenute mediante aCGH potessero avere un ruolo prognostico rilevante è dimostrato anche dal lavoro di Houldsworth et al. Tali autori hanno individuato nove CNV come marker di prognosi sfavorevole: gain: 2p, 3q, 8q, 17q e loss: 7q, 8p, 11q, 17p, 18q. Sulla base di tali evidenze, i pazienti venivano stratificati in 3 gruppi: sfavorevole, quelli in cui erano rilevate le nove anomalie sopra elencate, favorevole quelli con la sola del(13q) o in associazione con altre 10 anomalie (gain 1p, 7p, 12, 18p, 18q, 19 e loss: 4p, 5p, 6q, 7p) ed intermedio per tutti gli altri pazienti. Dall'analisi delle curve di sopravvivenza sembrerebbe che questo modello gerarchico di stratificazione potrebbe essere utile per classificare con maggiore accuratezza i pazienti nelle varie classi prognostiche. Inoltre essi hanno anche dimostrato che mutazioni di *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* sembrerebbero essere correlate con almeno uno dei nove marker di prognosi infausta rilevati dagli aCGH. Tali risultati avvalorano ancora di più il potere diagnostico di metodiche *genome wide* nella routine clinica, in quanto se tali osservazioni verranno confermate l'analisi del cariotipo molecolare ridurrebbe il bisogno di eseguire laboriose e costose analisi di sequenziamento (Houldsworth J. *Leukemia & Lymphoma.* 2014).

Dunque la possibilità di scrinare in un unico esperimento tutto il genoma, rilevando anomalie addizionali e definendo anche la loro dimensione, sembrerebbe consentire una più precisa definizione del rischio di progressione nei pazienti con LLC. Ciò dimostra la necessità di usare una metodica *genome wide* ad alta sensibilità nella routine clinica e la tecnica di cariotipizzazione molecolare NGS-based descritta in questo lavoro, grazie ai notevoli vantaggi tecnici ed economici potrebbe un ottimo strumento da introdurre nel *setting* clinico dei pazienti affetti da LLC.

5.2 PROGETTO 2

Nonostante i numerosi marker biologici proposti, soprattutto di tipo molecolare (mutazioni in *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*), le anomalie citogenetiche, rivenute mediante FISH, rimangono i principali fattori prognostici valutati per i pazienti con LLC e rilevarne la presenza resta alla base della corrente classificazione gerarchica (Van Dyke et al., *Br. J. Of Haematology* 2016). Tuttavia, è nota una notevole eterogeneità clinica nelle tre classi di rischio dell'attuale modello prognostico. Riuscire a predire il rischio di progressione e quindi individuare la strategia terapeutica più efficace, già alla diagnosi, è di fondamentale importanza, soprattutto alla luce del grande armamentario terapeutico ad oggi disponibile. Difatti, negli ultimi anni diversi gruppi di studio hanno cercato di individuare, non solo i migliori indicatori prognostici, ma anche di proporre modelli in grado di stratificare nel modo più accurato possibile i pazienti. Ad oggi, solo il modello proposto dal *CLL-IPI working group* sembra essere vantaggioso e promettente, nonostante la coorte di studio analizzata era significativamente più giovane (61 anni) rispetto all'età media dei pazienti con LLC (Baliaska P. et al. *Leukemia* 2016).

Tuttavia, nessuno dei modelli finora proposti prende in considerazione l'eterogeneità genetica intratumorale (ITH). Difatti sebbene da tempo sia noto che la LLC, come in genere tutte le neoplasie, è caratterizzata dalla coesistenza di molteplici popolazioni cellulari nell'ambito della stessa massa tumorale, ancora non è noto l'eventuale ruolo prognostico dell'ITH. Davis e collaboratori hanno dimostrato che la copresenza di tre anomalie rilevate mediante FISH, non coinvolgenti la del(17p), aveva un impatto negativo sul TTFT, simile ai pazienti con del(17p) (Davis et al., *Br. J. Haemtol.* 2015). Inoltre, gli stessi autori hanno anche osservato che pazienti con concomitante del(13q) e trisomia 12, mostravano un TTFT simile ai pazienti con la sola trisomia 12. Contrariamente, la presenza di una o più anomalie concomitanti con lesioni ad alto rischio sembrava non influenzare la prognosi.

Effettivamente dalla pratica clinica durante gli esami FISH di routine, è frequente analizzare casi in cui non solo sono presenti contemporaneamente diverse aberrazioni citogenetiche, ma esse possono essere presenti anche in percentuali asimmetriche nelle cellule tumorali; questo fenomeno indica l'esistenza di

subcloni citogenetici. Il numero di aberrazioni citogenetiche e la presenza/dimensione dei subcloni intratumorali, potrebbero avere un impatto sull'*outcome*, pertanto, tali caratteristiche dovrebbero essere prese in considerazione per determinare in maniera più accurata la prognosi nella LLC. Difatti Yi e collaboratori hanno dimostrato che sia il numero e/o la presenza di anomalie concomitanti che la taglia dei singoli cloni anomali coesistenti ha un impatto sulla prognosi, proponendo, pertanto, un nuovo modello prognostico che integri l'eterogeneità genetica intratumorale (Yi S. et al., *Genetic and Med.* 2016). Il dato rilevante che tali autori hanno svelato è che non sempre un'anomalia ad alto rischio è indice di prognosi infausta, ma va considerata in relazione alla coesistenza con altri cloni e alla loro reciproca taglia. Infatti nel lavoro di Yi e collaboratori emerge come il gruppo di pazienti con un clone sfavorevole come "minor clone" (*cut off* di discrepanza tra major e minor >30%) mostrava una OS maggiore rispetto a quelli in cui il clone sfavorevole era presente come "major clone".

Tale modello ha attirato la nostra attenzione, non solo perché prende in considerazione l'eterogeneità intratumorale della LLC, fenomeno alla base dell'evoluzione clonale e verosimilmente responsabile del variabile *outcome* clinico dei singoli pazienti, ma anche per la sua facile integrazione nella routine clinica. Difatti questo algoritmo, basandosi esclusivamente sul dato citogenetico, potrebbe essere facilmente integrato nella routine clinica, in quanto richiede esclusivamente l'impiego dell'analisi FISH, approccio già ampiamente utilizzato e validato nella prassi clinica. Nello specifico, la FISH consentendo di eseguire un'analisi su singola cellula, è uno strumento valido ed efficace per rilevare nell'ambito dello stesso paziente, la contemporanea presenza di più aberrazioni, ovvero di rendere manifesto il fenomeno dell'ITH. Abbiamo quindi provveduto a validare tale modello in una casistica *real life* di 105 pazienti. Dall'analisi della nostra coorte è emerso nel 44% (n=47) dei pazienti la contemporanea presenza di due o più anomalie, nello specifico 31% (n=33) di essi presentava due anomalie, l'11% (n=12) tre anomalie ed il 1,9% (n=2) quattro anomalie contemporaneamente. Inoltre, nel 12% (n=13) dei casi è stata dimostrata la coesistenza di un *minor unfavorable* clone ed un *major favorable* clone.

Prima di procedere con la validazione, abbiamo eseguito un'accurata analisi statistica dell'OS e TTFT (Kaplan-Meier e log-rank test) per verificare la corretta distribuzione dei pazienti nelle tre classi prognostiche del nuovo modello.

Innanzitutto in un modello che prende in considerazione il fenomeno dell'ITH, era indispensabile stabilire il significato prognostico della delezione biallelica del(13q), che ad oggi è ancora argomento di un acceso dibattito, anomalia rinvenuta nella nostra casistica nel 12% dei casi. Studi su campioni seriali suggeriscono che la delezione eterozigote sia un evento precoce, mentre l'eliminazione del secondo allele avvenga in una fase tardiva, avvalorando il concetto di evoluzione clonale nella LLC (Stilgenbauer S. et al *Haematologica* 2007). Difatti, secondo alcuni autori la delezione biallelica è associata ad una malattia più aggressiva con un peggiore impatto sull'*outcome* (Puiggros et al., *Biomed Res Int.* 2014). Altri autori, invece, non hanno riscontrato nessuna differenza clinica e prognostica tra i pazienti con delezione in eterozigosi e quelli con delezione in omozigosi (Garg R., et al. *Cancer.* 2012). In accordo con quest'ultimi dati della letteratura,

anche nella nostra casistica non è emersa nessuna differenza statistica né in termini di OS né in termini di TTFT, tra pazienti con del(13q) biallelica e monoallelica (Fig. 36a).

Altro argomento fortemente dibattuto, riguarda la prognosi per i pazienti con FISH negativa, un recente lavoro, eseguito mediante microarray dimostra che i pazienti con FISH negativa hanno un peggiore *outcome* (Mian M. et al., *Ann Oncol.* 2013). Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che la FISH, fornendo informazioni relative solo ai loci testati, non rileva anomalie citogenetiche addizionali che potrebbero essere responsabili di prognosi infausta. Dalla nostra analisi statistica è emerso che i pazienti con FISH negativa non avevano nessuna differenza significativa con il gruppo favorevole (Fig. 36b).

Infine, in accordo con Yi e collaboratori, anche nella nostra casistica è emerso che anomalie ad alto rischio presenti come minor clone, in rapporto ad un *major favorable clone*, sono indice di buona prognosi. Difatti, dall'analisi statistica, eseguita confrontando le curve di sopravvivenza del gruppo di pazienti con un *minor unfavorable clone* ed il gruppo appartenente alla classe di rischio sfavorevole (Fig. 36c), sebbene non sia stata individuata differenza statistica nell'OS (nonostante il considerevole *trand* tra le curve), è emersa una differenza significativa tra il TTFT ($p=0,0254$) dei due gruppi a confronto. Inoltre sia la mediana di sopravvivenza (88 vs 69 mesi), che la mediana del tempo al primo trattamento (64 vs 47 mesi), era più lunga nei pazienti con *minor unfavorable clone* rispetto al gruppo sfavorevole. Un'ulteriore conferma del ruolo prognostico favorevole del *minor unfavorable clone*, è data dalla mancata differenza statistica, sia in termini di OS che TTFT, emersa dal confronto di tale gruppo con i pazienti a prognosi favorevole (Fig. 36d). Quest'ultimo risultato appare in contrasto con il lavoro di Rossi et al., che mediante metodiche di NGS ad altissima risoluzione, ha dimostrato che mutazioni in *TP53* anche in piccoli subcloni sono associate ad *outcome* sfavorevole. Tuttavia, tale lavoro, focalizzandosi solo sulle mutazioni di *TP53*, non prende in considerazione la copresenza di altri cloni, per cui in tal caso non si può distinguere tra minor e major clone, inteso come rapporto tra due cloni (Rossi et al., *Blood* 2014). Pertanto, i risultati del presente studio non sono completamente discordanti dal lavoro di Rossi, poiché anche nella nostra casistica cloni con sole anomalie sfavorevoli erano responsabili di un *outcome* infausto. Le anomalie ad alto rischio acquistano una connotazione favorevole solo se presenti come minor clone in rapporto ad un *major favorable clone*. Non è chiaro perché un *minor unfavorable clone* non determini un decorso clinico infausto. La spiegazione potrebbe essere legata ai meccanismi di competizione che si possono creare tra i due cloni. Nello specifico, il *major favorable clone*, avendo un maggiore potenziale proliferativo, potrebbe bloccare, o almeno controllare, la crescita del clone sfavorevole.

Alla luce di tali risultati, abbiamo provveduto alla stratificazione dei pazienti in base al modello prognostico convenzionale e al nuovo modello. Il 12% dei pazienti è stato ristratificato. Nello specifico, nel nuovo modello prognostico i pazienti destinati alla classe sfavorevole erano in numero minore (34 vs 47), aumentando conseguentemente il numero dei pazienti nella classe favorevole (59 vs 47) (Tab. 16).

	CLASSIFICAZIONE CONVENZIONALE	N. PTS (%)	NUOVA CLASSIFICAZIONE	N. PTS (%)
Favorevole	del(13q) e/o FISH neg	47 (45%)	del(13q) e/o FISH neg e/o clone sfavorevole come minor	59 (56%)
Intermedio	Trisomia 12 e/o t(14q32)	11 (10%)	Trisomia 12 e/o t(14q32) e/o ≤ 2 abs neutrali compresenti	12 (11,5%)
Sfavorevole	del(11q) e/o del(17p)	47 (45%)	del(11q) e/o del(17p) e/o clone sfavorevole come major e/o ≥ 3 abs favorevoli/neutre concomitanti	34 (32,5%)

Tabella 16. Sono riportati il numero e la percentuale di pazienti per ciascuna classe di rischio, sia in base al modello convenzionale, sia in base al nuovo modello. In grassetto le differenze tra i due modelli. *Abbrev. PTS: pazienti; abs: anomalie.*

L'analisi statistica ha mostrato significatività sia per l'OS ($p=0,0377$) e soprattutto per il TTFT ($p=0,0005$) nel nuovo modello, mentre, sorprendentemente, l'OS calcolata per il modello convenzionale è risultata non significativa (Fig. 38). Dunque, dalla nostra analisi è emerso che nel gruppo sfavorevole convenzionale sono inclusi pazienti che in realtà presentano un decorso clinico favorevole, con una lunga mediana di sopravvivenza e di tempo al primo trattamento. Abbiamo in tal modo, confermato i dati di Yi e collaboratori, dimostrando che la disomogeneità della stadiazione di Dohner potrebbe, almeno in parte, essere causata dall'ITH. Pertanto, integrare nozioni di ITH al modello convenzionale potrebbe consentire una stratificazione più accurata dei pazienti.

D'altro canto il nuovo modello prognostico trova ragione nella caratteristica principale dell'eterogeneità intratumorale, ovvero la sua capacità di alimentare l'evoluzione clonale e la generazione di sottopopolazioni resistenti alla terapia (Gerashchenko T.S. et al., *Biochemistry* 2013). Nella nostra casistica, la condizione di ITH veniva svelata anche dalla citogenetica convenzionale. Nello specifico, l'analisi del cariotipo è stata eseguita in 58 pazienti alla diagnosi, con esito positivo in 51 di essi, e in 19 pazienti al *follow up*. La citogenetica convenzionale ha dimostrato la notevole complessità genomica della LLC, rilevando cariotipi anomali nel 37,2% (19/51) dei casi alla diagnosi e nel 58% (11/19) dei casi al *follow up*. In particolare, in accordo anche con i dati della letteratura (Rigoling et al., *Joun. of Hem. & Onc.* 2016), il cariotipo complesso (CK), presente nel 12% dei pazienti alla diagnosi (6/51), era quasi sempre associato ad anomalie ad alto rischio ed una forma aggressiva della malattia, ovvero in stadi avanzati della classificazione RAI e BINET. Emblematico il caso di due pazienti, che sebbene mostrassero cariotipo complesso sia alla diagnosi che al successivo *follow up*, hanno mantenuto una malattia stabile, senza necessità di terapia. In uno dei due casi citati, il CK non era associato ad anomalie ad alto rischio [del(17p) o del(11q)] (Tab. 13).

Alla luce dei risultati e delle considerazioni emerse dalla validazione del modello prognostico, per i pazienti ($n=52$) della casistica di cui erano disponibili più prelievi è stato eseguito un accurato studio longitudinale, confrontando l'architettura clonale rinvenuta alla diagnosi con quella analizzata nei successivi *follow up*.

Lo studio di composizione clonale ha evidenziato alla diagnosi il 37% (n=19) dei pazienti con ITH, il 44% (n=23) dei pazienti con monoclonalità (intesa sia con un'unica anomalia che con presenza di due anomalie in uno stesso clone), ed il 19% (n=10) dei pazienti con FISH normale.

Durante un tempo osservazionale medio di 61 mesi, il 48% dei pazienti (n=25) è andato incontro a CE, definita come l'acquisizione di nuove anomalie citogenetiche rinvenute mediante FISH (Janssen et al., *Eu J Haematol.*, 2012), in media dopo 56 mesi dalla diagnosi, (*follow up* medio della casistica 98 mesi). La del(17p13) è risultata essere l'anomalia più frequentemente acquisita durante il *follow up*; nella maggior parte dei casi appariva come anomalia subclonale (range di positività cellulare <20%).

Interessante notare che nel 17% (9/52) dei casi è emersa la monosomia 12 con un tempo mediano d'insorgenza dalla diagnosi di 147 mesi (range: 76-247 mesi) e con un tasso di positività medio del 11,2% (range 5%-49%). Tale anomalia è stata descritta in letteratura solo in due pazienti con LLC (Antić D., *Vojnosanit Pregl.* 2010), pertanto il significato prognostico ed il suo eventuale ruolo patogenetico è sconosciuto. Nello specifico, nella nostra casistica, un paziente ha sviluppato la monosomia 12 in un periodo osservazionale, calcolato dalla diagnosi al secondo *time point*, di 157 mesi e senza aver mai necessitato di terapia, sebbene nei rimanenti pazienti sia stata rinvenuta quasi sempre nelle fasi tardive dell'evoluzione della malattia, dopo diverse linee di terapia e nella maggior parte dei casi (8/9) dopo lo *switch* a terapia con i novel agent. In 6 su 9 pazienti è emersa in associazione alla del(17p), mentre nei rimanenti in associazione alla del(11q) e in 2 pazienti in associazione al cariotipo complesso e a cloni poliploidi. Sembra trattarsi, dunque, di un clone *fitter*, resistente a terapia ed associato ad instabilità cromosomica. Ulteriori studi sono necessari per svelare l'eventuale ruolo di tale lesione genetica nel processo evolutivo e nella patogenesi della LLC.

In merito alle anomalie ad alto rischio, qualora presenti all'esordio della malattia o pre-trattamento, sebbene siano state considerate marker predittivi di CE in alcuni studi (Cavazzini et al. *Leuk Lymphoma* 2012), dal nostro lavoro non emerge alcuna associazione tra la presenza di del(11q) e/o del(17p) ed il rischio di sviluppare CE, in accordo con Hung et al. (Hung J. et al *Cancer Genetics.*, 2017). Difatti, il 64% dei pazienti (n=16) che è andato incontro ad evoluzione clonale presentava alla diagnosi anomalie con significato prognostico favorevole o neutrale. Tuttavia è interessante notare che in tutti i pazienti evoluti l'anomalia favorevole, ovvero la del(13q), era presente al T₁ in un'alta percentuale di cellule anomale (TPCM: 89%, range 85%-90,5%). Anche i pazienti con la del(17p) che sono andati incontro a CE erano caratterizzati da un clone di grossa taglia (TPCM: 65%, range 41%-78%). Contrariamente, nei pazienti non evoluti la del(17p) appariva come lesione subclonale (TPCM: 25%, range 8%-89%).

Come già ampiamente riportato in letteratura, anche nella nostra casistica sono state osservate le due modalità evolutive proposte per la LLC, ovvero evoluzione *lineare* e *branching*. In accordo con Landau e collaboratori, le due dinamiche evolutive sembrerebbero essere associate ad un diverso decorso clinico (Landau et al., *Cell.* 2013). Difatti, ad eccezione di un solo caso, l'evoluzione *branching* nella nostra coorte

è stata rinvenuta sempre in associazione a progressione di malattia, mentre l'evoluzione lineare sia in pazienti con progressione di malattia che in pazienti non trattati e, quindi, in una fase clinicamente stabile. In ogni caso, a prescindere dal tipo di dinamica evolutiva, una condizione di CE era strettamente associata a progressione di malattia. Nello specifico, l'80% dei pazienti (n=20) in evoluzione clonale mostrava una malattia in progressione clinica, con necessità di trattamento terapeutico. D'altro canto, i pazienti evoluti hanno mostrato un TTFT significativamente più breve ($p < 0,0001$), rispetto ai pazienti trattati non evoluti (29 vs 49 mesi). Nonostante, la stretta associazione tra progressione di malattia e CE, l'OS medio dei pazienti evoluti era sovrapponibile al gruppo di pazienti non evoluti (107 vs 101 mesi), senza differenza statistica tra i due gruppi. Ad oggi ancora non è chiaro il ruolo prognostico della CE, probabilmente perché dipende da diversi fattori che non possono essere rilevati dalla sola analisi citogenetica, come l'acquisizione di mutazioni geniche. Inoltre, sembrerebbe che l'impatto negativo sulla OS, dipenda soprattutto dal tipo di anomalie citogenetiche acquisite. L'acquisizione di anomalie ad alto rischio (CE high risk) sembrerebbe impattare in modo negativo sulla prognosi (Huang J. Et al *Cancer Gen.*, 2017). A causa della piccola casistica, non è stato possibile valutare quest'aspetto. Tuttavia quasi tutti i pazienti con anomalie favorevoli o a rischio intermedio alla diagnosi (87,5%, 14/16) acquisivano anomalie ad alto rischio durante il decorso della malattia. E' probabile che l'introduzione di nuove strategie terapeutiche, bypassando l'impatto prognostico sfavorevole delle anomalie acquisite, possa spiegare, almeno in parte, il miglioramento in termini di *outcome* anche nei pazienti con CE.

Inoltre il presente lavoro dimostra che l'evoluzione clonale non dipende esclusivamente dal trattamento terapeutico, poiché è stata rinvenuta, seppure in minor misura, anche nei pazienti non trattati (n=5). E' interessante notare che in questi pazienti l'evoluzione clonale era associata ad una malattia stabile, nonostante la comparsa di anomalie ad alto rischio. L'insorgenza di CE, anche in assenza di trattamento, rivela un importante concetto, ovvero che fenomeni intrinseci, legati alle caratteristiche del clone leucemico e/o il microambiente tumorale, possano influenzare l'evoluzione clonale. Proprio alla luce di tale considerazione, abbiamo valutato attentamente se la composizione clonale rinvenuta alla diagnosi potesse essere correlata all'evoluzione clonale. Sorprendentemente, sebbene l'ITH sembrerebbe essere una condizione "trigger" del processo evolutivo, dal presente lavoro è emerso che, la maggiore incidenza di CE è stata rinvenuta tra i pazienti monoclonali, mentre solo il 15% dei pazienti con ITH andava incontro a CE. Tuttavia nel gruppo dei monoclonali si concentrava anche la maggiore incidenza di pazienti trattati, suggerendo che il trattamento terapeutico favorisca, o quantomeno acceleri, il processo di evoluzione clonale. Un'ulteriore conferma della pressione esercitata dalla terapia deriva dall'evidenza che nel gruppo degli ITH il trattamento, prevalentemente la chemio-immunoterapia, ha mostrato un effetto esclusivamente sui cloni favorevoli, inducendo la riduzione della taglia di tali cloni, e la contemporanea selezione dei cloni *fitter*. In tal modo, "l'estinzione di massa" dei cloni favorevoli (Landau et al., *Cell* 2013) provocata dalla terapia rappresenta una condizione ottimale per il clone *fitter* che, non dovendo più competere con gli altri cloni (clonal competition), è libero di espandersi (Fig. 44). Tale fenomeno potrebbe essere alla base della refrattarietà alla terapia e della recidiva.

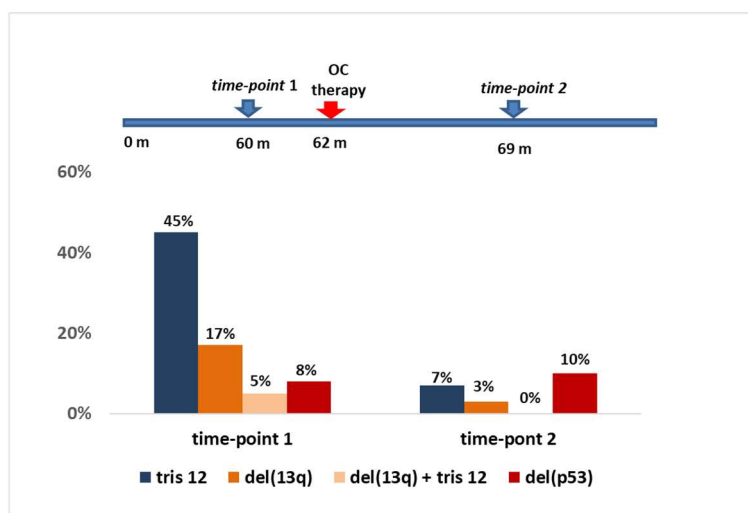


Figura 44. Istogramma rappresentativo dell'azione negativa esercitata dalla chemio-immunoterapia sull'architettura clonale. Al *time-point 1* è evidente una notevole condizione di ITH; al *time point 2*, post OC (Obinotuzumab +Clorambucile), è nota una notevole riduzione dei cloni con anomalie favorevoli e selezione del clone *fitter* con del(p53).

In considerazione di quanto detto sinora, soprattutto in pazienti con ITH, l'inizio del trattamento dovrebbe essere ponderato con estrema cautela, in quanto la pressione terapeutica potrebbe andare a distruggere l'equilibrio che si stabilisce tra le varie popolazioni clonali, selezionando i cloni *fitter*, responsabili di refrattarietà alla terapia e di recidiva. Ulteriore conferma di tale concetto, è stata fornita dal gruppo di pazienti ITH non trattati, in cui nella maggior parte dei casi (62,5%), la composizione clonale tra la diagnosi ed il successivo *follow up* rimaneva costante, condizione nota come "equilibrio clonale", ovvero la proporzione dei cloni rimane invariata, sia in caso di aumento o di diminuzione della taglia. In accordo con i dati della letteratura (Greaves M et al., *Nature* 2012), tale dinamica evolutiva era strettamente associata ad una malattia stabile, nonostante marker di prognosi sfavorevole [del(17p), del(11q) e CK]. Quest'ultima considerazione avvalorava il nuovo modello prognostico, in quanto anche dallo studio longitudinale emerge che la composizione clonale, piuttosto che la qualità e presenza/assenza delle anomalie, ha un impatto importante sul decorso clinico.

Nel restante 37.5% dei casi dei pazienti ITH non trattati, si osservava una condizione di sbilanciamento clonale o di evoluzione clonale. La condizione di sbilanciamento clonale, ovvero variazioni nelle proporzioni tra i cloni, sembrerebbe essere una fase preliminare della CE, difatti tale dinamica evolutiva era sempre associata ad una riduzione dei soli cloni favorevoli, facilitando l'espansione di cloni con anomalie ad alto rischio. Dunque, viene così dimostrato che non solo la terapia, ed in particolare la chemio-immunoterapia, bensì anche forze intrinseche, ad oggi sconosciute, siano responsabili delle perturbazioni nell'equilibrio stabilitosi nel tempo tra i vari cloni.

Una condizione concettualmente simile, ma clinicamente diversa dall'equilibrio clonale, è rappresentata dalla stabilità clonale, in cui il e/o i cloni non vanno incontro a nessun cambiamento né in termini di taglia,

né in termini di acquisizione di nuove anomalie. Tale condizione è emersa, in tutte le tre classi di pazienti, ITH, monoclonali e FISH negativi, ed era quasi esclusivamente associata a refrattarietà alla terapia e progressione della malattia. La differenza tra stabilità clonale ed equilibrio clonale, è legato all'evidenza che nel primo caso la dinamica evolutiva si associa prevalentemente a progressione di malattia e refrattarietà al trattamento terapeutico, nel secondo caso invece l'equilibrio clonale è associato esclusivamente ad una malattia stabile nonostante marker di prognosi infausta. Inoltre la prima condizione, a differenza dell'equilibrio clonale, si osservava solo in pazienti trattati. Alla luce di tali considerazioni è stata avanzata l'ipotesi che la stabilità clonale rappresenti una fase tardiva della CE in cui è stato selezionato il clone e/o i cloni più *fitter* che non essendo scalfiti dal trattamento terapeutico inducono mancata risposta al trattamento e recidive.

Infine dalla presente casistica emerge che effettivamente la terapia con i *novel agent* non solo induce riduzione della taglia del clone e risposta al trattamento in maggior misura rispetto alla chemio-immunoterapia, ma sembra anche esercitare una condizione di pressione sui cloni, mentendo una condizione di equilibrio clonale ed evitando l'espansione del clone *fitter* (Fig. 45).

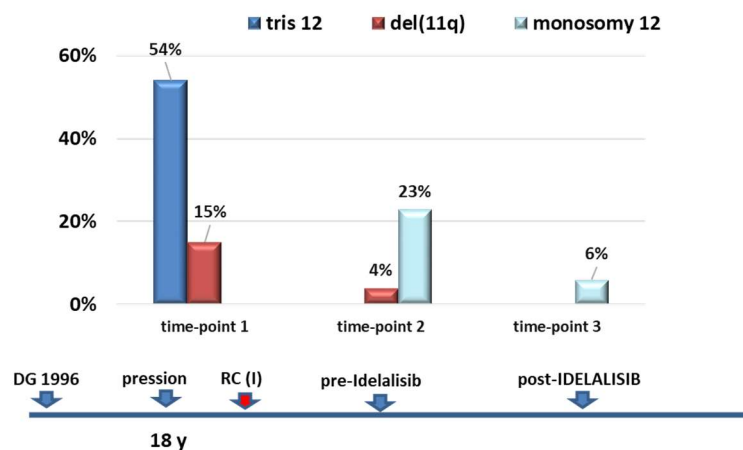


Figura 45. Istogramma rappresentativo dell'azione esercitata dal trattamento terapeutico, in un paziente ITH. La chemio-immunoterapia (Rituximab + Clorambucile, fraccia rossa), induce eradicazione del solo clone favorevole (con trisomia 12) e comparsa di una nuova anomalia (monosomia 12). Il trattamento con Idelalisib, non solo elimina anche il clone con del(11q) ma riduce il clone con monosomia 12.

Tuttavia, seppure in pochi casi, anche dopo trattamento con i *novel agent* è stata osservata l'emergenza di nuove anomalie, dimostrando che sono necessari altri *trials* per verificare il ruolo positivo e/o negativo di tali agenti terapeutici sulle dinamiche evolutive della LLC.

Infine confermiamo i dati della letteratura (Xose S.P. et al., *Nat Genet.* 2013) secondo cui il trattamento con la chemioterapia sembra accelerare il processo di CE, soprattutto favorendo la comparsa di cloni con anomalie ad alto rischio. Difatti nel 60% dei pazienti sono emersi cloni con del(17p) e del(ATM) post chemioterapia in associazione o meno all'immunoterapia. Tuttavia bisogna sottolineare che la comparsa di

del(17p) è emersa anche in pazienti evoluti ma non trattati, dimostrando che l'insorgenza di tale anomalia è terapia indipendente, in accordo con i dati di Quiette et al (Quiette P. et al. *Clin Cancer Res.* 2013).

6. CONCLUSIONI

6.1 Progetto 1

I risultati del primo progetto di ricerca hanno dimostrato che la FISH sottostima la complessità genomica della LLC. Infatti, anche nella nostra seppur piccola casistica, l'analisi dei profili di CNV mediante aCGH +SNP array e LPS ha mostrato nel 50% dei pazienti anomalie aggiuntive non scrinate dal pannello FISH standard. Alcune di queste anomalie aggiuntive, come trisomia 19, gain 8q, sono riportate in letteratura come lesioni frequenti nei campioni della LLC, ed in particolare il gain 8q, è dimostrato essere un marker di prognosi sfavorevole. Inoltre l'analisi *genome wide* ha rilevato in un maggior numero di casi la presenza di cariotipi complessi (≥ 3 anomalie) e alla luce delle attuali evidenze scientifiche secondo cui i cariotipi complessi sono ormai considerati marker di prognosi sfavorevole, risulta necessario il loro rilevamento per garantire una corretta stratificazione prognostica.

I risultati ottenuti confrontando le varie tecniche hanno rilevato, innanzitutto, che la citogenetica convenzionale e la FISH sono delle metodiche sinergiche che associate rimangono degli ottimi strumenti nel *setting* clinico dei pazienti con LLC. Pertanto, l'unica metodologia di citogenetica molecolare su cui investire, dati i notevoli vantaggi tecnici (l'alta risoluzione, l'alta sensibilità e la possibilità di definire facilmente la dimensione dell'anomalia) ed economici per una futura introduzione nella pratica clinica, è l'approccio di cariotipizzazione molecolare (LPS) basato sulla tecnologia NGS. Tuttavia sono necessari ancora analisi prospettiche per meglio definire le *performace* e per stabilire i criteri standard per la corretta interpretazione dei risultati.

Inoltre il presente lavoro dimostra che la CN-LOH non è un evento raro nella LLC, essendo stata rinvenuta anche nella nostra piccola casistica. Pertanto è necessario eseguire studi di *genome wide* per definire il ruolo patogenetico e prognostico di questa nuova anomalia genetica. La CN-LOH potrebbe rilevare nuovi geni correlati alla patogenesi della LLC e quindi nuovi *target* su cui le terapie mirate potrebbero agire.

Concludendo, sebbene le metodiche di *genome wide*, come la LPS, forniscano informazioni aggiuntive è ancora materia di dibattito come usare, nel miglior modo possibile, tali informazioni nella pratica clinica. Perciò in base alle attuali conoscenze, al momento è ancora impossibile sostituire completamente la FISH nella pratica clinica essendo la metodica a più alta sensibilità ma piuttosto dovrebbe essere sempre integrata dalla citogenetica convenzionale, per definire meglio la complessità genetica dei campioni analizzati. Tuttavia una volta definito il ruolo prognostico delle anomalie aggiuntive, la FISH dovrà essere

necessariamente affiancata da piattaforme di *whole genome scanning* ad alta risoluzione ed in questo contesto l'approccio NGS descritto nel presente lavoro potrebbe essere un valido candidato.

6.2 Progetto 2

Il secondo progetto del presente lavoro di tesi ha dimostrato come la stratificazione prognostica non possa prescindere dalla valutazione dell'eterogeneità genetica intratumorale. Integrare nozioni di ITH consente una distribuzione dei pazienti più accurata nelle tre classi di rischio. E' stato dimostrato che non sempre un'anomalia ad alto rischio è indice di un decorso clinico infausto, ma ciò dipende dalla composizione clonale. Difatti un'anomalia ad alto rischio, se presente come "*minor clone*" identifica pazienti a buona prognosi con una lunga sopravvivenza media ed un lungo TTFT medio. E' stato pertanto confermato, e validato, il modello prognostico proposto da Yi e collaboratori, fondato non solo sulla qualità delle anomalie citogenetiche ma anche sulla taglia del clone.

L'alta incidenza della del(17p) durante il *follow up*, sia post terapia che in assenza di intervento terapeutico, dimostra l'importanza della rivalutazione citogenetica ogni qualvolta risulti necessario iniziare un primo e/o un nuovo trattamento.

L'analisi longitudinale in FISH ha dimostrato la presenza di cloni *fitter* in grado di evolversi lentamente, soprattutto sotto la pressione selettiva esercitata dal contesto terapeutico, ma anche, seppur in minor misura, da forze intrinseche degli stessi cloni o del microambiente, favorendo la loro espansione rispetto alla popolazione neoplastica d'origine. In particolare, è stato confermato che il trattamento con chemio-immunoterapia favorisce l'evoluzione clonale selezionando cloni *fitter*, mentre i "*new targeted drugs*" sembrerebbero garantire una riduzione/eradicazioni dei cloni ed esercitare una pressione di controllo sui cloni *fitter* persistenti.

Inoltre, dal presente studio appare come l'evoluzione clonale non sia sempre correlata alla progressione di malattia ed è emerso come essa non sembri influenzare l'OS ma, piuttosto, avere un impatto sul TTFT.

Alla luce della teoria proposta da Landau circa l'evoluzione della LLC (Landau et al., *Cell*. 2013), in questo lavoro è emerso come, oltre all'evoluzione clonale, intesa come acquisizione di nuove anomalie citogenetiche durante la progressione della malattia, la FISH consenta di distinguere altre dinamiche evolutive che sembrerebbero essere associate al decorso clinico, ovvero la condizione di "equilibrio clonale" (clonal equilibrium), associato con la stabilità clinica, la condizione di "stabilità clonale" (clonal stability), intesa come mancata risposta alla terapia e recidiva, la condizione di "sbilanciamento clonale" (clonal imbalance), intesa come selezione di cloni *fitter* in presenza o assenza di pressione esercitata dalla terapia (selezione clonale), condizione, questa, prevalentemente associata a progressione di malattia e la

dinamica di riduzione/eradicazione dei cloni (clonal reduction/eradication), intesa come risposta alla terapia.

Infine, l'analisi di citogenetica convenzionale ha dimostrato non solo la notevole complessità genomica della LLC, data la notevole incidenza di cariotipi anomali, ma ha anche confermato come il cariotipo complesso sia associato ad una malattia notevolmente aggressiva.

In conclusione, tale lavoro di tesi sottolinea la necessità di effettuare analisi FISH sequenziali nell'ambito della LLC, volte a definire la composizione clonale (eterogeneità genetica intratumorale) alla diagnosi, al momento del trattamento e nei successivi *follow-up*, per poter meglio predire la progressione della malattia e la risposta alla terapia. La FISH e la citogenetica convenzionale rappresentano un ottimo strumento di indagine atto a tale scopo.

Per i pazienti con una condizione di ITH emersa già alla diagnosi o in fase di pre-trattamento, l'eventuale inizio della terapia dovrebbe essere valutato con estrema cautela, anche in presenza di cloni ad impatto prognostico sfavorevole, poiché l'esposizione al trattamento terapeutico potrebbe rappresentare una pressione selettiva che andrebbe a disturbare un'eventuale condizione di "clonal equilibrium", favorendo l'espansione del clone sfavorevole "*fitter*". A tal proposito l'approccio "*watch and wait*", in associazione ad un *follow up* a tempi più ristretti, sembrerebbe rappresentare la strategia più appropriata.

Tuttavia ulteriori studi longitudinali sono necessari per definire i meccanismi alla base del processo evolutivo nella LLC e soprattutto per confermare l'associazione tra le diverse dinamiche evolutive ed il decorso clinico. Data la sempre crescente disponibilità di nuove strategie terapeutiche, basate sull'uso dei "*new targeted drugs*", comprendere i meccanismi e le caratteristiche genetiche alla base dell'evoluzione clonale rimane una priorità importante nella gestione del paziente affetto da LLC.

Ringraziamenti

Tre anni sono lunghi come la lista di persone da ringraziare. Innanzitutto ringrazio il prof. Franco Aversa per avermi accolto nel suo stuff, per la sua disponibilità, per l'aiuto e soprattutto lo ringrazio per il supporto pratico e morale prima della mia partenza per il Belgio.

Esprimo la mia gratitudine al prof. Quaini per la sua disponibilità e per avermi aiutato a completare il mio percorso studi e di ricerca.

Grazie alla Dr.ssa Sammarelli, o meglio grazie alla Gabry. Grazie per tutto ciò che mi hai insegnato in questi anni, grazie perché se oggi sono una "piccola" citogenetista il merito è tuo. Grazie per l'affetto che mi hai dimostrato, per aver compreso i miei mille momenti di sconforto e per le ore spese a trovare una soluzione ai miei piccoli problemi. Grazie per i tanti, ma veramente tanti, bei momenti trascorsi insieme. Grazie per avermi accolto non solo nel tuo laboratorio ma soprattutto nella tua splendida famiglia.

Grazie alla prof. Michaux per avermi consentito di trascorrere sei mesi nel prestigioso centro di genetica umana di Leuven. Ringrazio soprattutto la Dr. Dewaele che mi ha seguito durante questa mia esperienza. Ringrazio anche tutti i tecnici ed il personale del CME non solo per quello che mi hanno insegnato ma soprattutto per avermi accolto con entusiasmo nel loro team.

Grazie alla Giannalisa, collega e amica di questa avventura iniziata quattro anni fa. Grazie per il tuo supporto e soprattutto per avermi aiutato a controllare e vincere le mie ansie.

Grazie all'Annetta, grazie per essermi stata accanto sempre e comunque. Grazie per avermi aiutato a superare i momenti peggiori di questa esperienza, per le nostre infinite chiacchierate e soprattutto per tutti i momenti divertenti che abbiamo trascorso in questi due anni.

Ringrazio le persone che hanno condiviso con me l'esperienza in Belgio, Claudia, Miachaela, Giulia, ma soprattutto grazie ad Emanuela con cui ho condiviso solo due mesi, seppur pochi, abbastanza per far nascere l'amicizia che ci lega. Un grazie anche Federica ed Agnese per tutte le piacevolissime serate trascorse insieme. Grazie per aver alleviato la nostalgia di casa.

Un enorme grazie alla Dr. Russo senza il cui aiuto non sarebbe stato possibile realizzare parte del mio progetto di ricerca.

Un grazie speciale va a Marco, grazie per tutte le volte che hai ascoltato le mie lamentele, per aver sempre cercato una soluzione ai miei problemi, per non avermi mai fatto mancare nulla nonostante la distanza e soprattutto per aver accettato e sopportato la lontananza. Grazie amore mio per essere stato sempre al mio fianco e per aver sempre creduto in me.

Infine il grazie più importante va alle persone che mi hanno sempre sostenuto, che mi hanno dato la possibilità di scegliere e di costruire il mio futuro professionale, grazie per tutti i viaggi su e giù per l'Italia che avete fatto per me, grazie perché tutti i traguardi che ho raggiunto fin ad oggi sono solo merito dei vostri sacrifici. Grazie mamma e papà.

Bibliografia

- 1) **Adam R.**, Diez-Gonzalez L, Ocana A, et al. (2017) “Prognostic role of telomere length in malignancies: A meta-analysis and metaregression”. *Exp Mol Pathol*;102:455–474
- 2) **Amaya-Chanaga C.I.**, Rassenti L.Z.. (2016) “Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers.” *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016;29(1):79-89.
- 3) **Antić D.**, Dencić-Fekete M., Tomin D., Djunić I. (2010)“Monosomy 12 and deletion of 13q34 in a case of chronic lymphocytic leukemia with concomitant lung cancer.” *Vojnosanit Pregl.*;67(10):864-6.
- 4) **Bahlo J.**, Kutsch N, Bergmann M. (2015) “The international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL-IPI) – an international meta-analysis”. *Haematologica*,100:313-4
- 5) **Baliakas P.**, Hadzidimitriou A. (2015) “Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia”. *Leukemia*. 29(2):329-36.
- 6) **Baliakas P.**, Mattsson M. (2016). “Prognostic indices in chronic lymphocytic leukaemia: where do we stand how do we proceed?.” *J Intern Med* 279: 347–357.
- 7) **Binet J.L.**, Auquier A, Dighiero G. et al., (1981) “A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis”. *Cancer*; 48,198-206.
- 8) **Boddu P.**, Ferrajoli A. (2018) “Prognostic Factors in the Era of Targeted Therapies in CLL.” *Curr Hematol Malig Rep*.13(2):78-90
- 9) **Bulian P.**, Shanafelt TD, Fegan C et al. (2014) “CD49d Is the Strongest Flow Cytometry-Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia”. *J Clin Oncol*. 2014;32(9):897-904.
- 10) **Campo E.**, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. “The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications.” *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019-32.
- 11) **Cavazzini F.**, Rizzotto L., Sofritti O., Daghia G., et al (2012) “Clonal evolution including 14q32/IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlations in 105 patients”. *Leuk Lymphoma.*;53(1):83-8.
- 12) **Chapiro E.**, Leporrier N., Radford-Weiss I., Bastard C. et al (2010) “Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages”. *Leuk Res*;34(1):63-8.
- 13) **Chena C.**, Avalos JS et al. (2008) “Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies”. *Eur J Haematol*.81, 94-99
- 14) **Chiarozzi N.** (2012)“Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia”. *Hematology Am Soc Hematol Educ*. Vol. 76-87 2012
- 15) **Chiorazzi N.**, Ferrarini M., (2011) “Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities.” *Blood*; 117(6):1781-1791.
- 16) **Crespo M.**, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. (2003) “ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia”. *N Engl J Med*.1;348(18):1764-75.
- 17) **Dal Bo M.**, Rossi FM, et al. (2011) “13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia”. *Genes Chromosomes Cancer*. 50: 633-643
- 18) **Damle RN.**, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, et al (1999) “Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood*;94(6):1840-7.
- 19) **Dauids M.S.**, Vartanov A., Werner I. et al (2015) “Controversial fluorescent in situ hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. New insight from large cohort. *Br J. Hametol*; 170:964-703.

- 20) **De Falco F.**, Sabatini R., Del Papa B., et al.(2015) “Notch signaling sustains the expression of Mcl-1 and the activity of eIF4E to promote cell survival in CLL”. *Oncotarget*. 6(18): 16559–16572.
- 21) **Delgado J.**, Doubek M., Baumann T., Kotaskova J.,Molica S., Mozas P., et al (2017) “Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI Am J Hematol”;92(4):375-380.
- 22) **Dewald G.W.**, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TE, Call TG, Kay NE.(2003) ”Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia” *Br J Haematol.*;121(2):287-95.
- 23) **Döhner H.**, Stilgenbauer S, Benner A et al. (2000) “Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.” *N Engl J Med* 26:1910-6.
- 24) **Edelmann J.**, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A,et al (2012) “ High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations”. *Blood*. 6;120(24):4783-94.
- 25) **Fabbri G.**, Dalla-Favera R. (2016). “The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia.” *Nat Rev Cancer*; 16(3):145-62.
- 26) **Fabris S.**, Scarciolla O., Morabito F., Cifarelli R.A., Dininn C., et al., (2011). “Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization to detect chromosomal abnormalities in Chronic lymphocytic leukemia: A comparative study”. *Genes Chromosomes Cancer.*;50(9):726-34.
- 27) **Ferrajoli A.**, Shanafelt TD., Ivan C., Shimizu M., Rabe KG. et al (2013) “Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia” *Blood*. 2013.
- 28) **Flinn IW**, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, et al., (2007) “Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia”: US Intergroup Trial. *J Clin Oncol*;25:793-798.
- 29) **Foà R.**, Del Giudice I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. (2013) “Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia”. *Haematologica.*;98(5):675-85
- 30) **Garg R.**, Wierda W., Ferrajoli A., Abruzzo L., Pierce S., et al (2012) “The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer.*;118(14):3531-7.
- 31) **Gentile M**, Mauro FR et al (2014) “Det al.Italian external and multicentric validation of the MD Anderson Cancer Centernomogram and prognostic index for chronic lymphocytic leukaemia patients: analysis of 1502 cases”. *Br J Haematol*;167:224–32
- 32) **Gerashchenko T.S.**, Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova MV, Vtorushin SV, Tsyganov MM, Perelmuter VM, Cherdyntseva NV. (2013) “Intratumor heterogeneity: nature and biological significance”. *Biochemistry* 78(11):1201-15.
- 33) **Ghamlouch H.**, Nguyen-Khac F. and Olivier A. Bernard1 (2017) “Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era”. *British Journal of Haematology*:178, 852–870.
- 34) **Ghia P**, Prato G, Scielzo C et al. (2004) “Monoclonal CD5⁺ and CD5⁻ B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly”. *Blood*;103(6):2337-42.
- 35) **Goldin L.R.**, Björkholm M., Kristinsson S.Y. et al. (2009) “Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Haematologica.*;94(5):647-53.
- 36) **Greaves M.**, Carlo C. Maley (2012) “Clonal evolution in cancer” *Nature*;481:306–313.
- 37) **Grygalewicz B.**, Woroniecka R, Rygier J., Borkowska K.,Rzepecka I., et al (2016). “Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH Haematological Cancer and SNP array (8x60K)”. *Mol Cytogenet.*; 9: 1.

- 38) **Gunn S.R.**, Bolla A.R., Barron L.L., et al (2009) “Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene” *Leuk Res.*;33(9):1276-81.
- 39) **Gunn S.R.**, Mohammed M.S., Gorre M.E., Cotter P.D., Kim J., Bahler D.W., (2008) “Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia”. *J Mol Diagn.*;10(5):442-51
- 40) **Gunnarsson R.**, Mansouri L., Isaksson A., Göransson H., Cahill N., et al.,(2011) “Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia”. *Haematologica*;96(8):1161-9.
- 41) **Hagenkord J.M.**, Monzon F.A., Kash SF, Lilleberg S, Xie Q, Kant JA. (2010) “Array-based karyotyping for prognostic assessment in chronic lymphocytic leukemia: performance comparison of Affymetrix 10K2.0, 250K Nsp, and SNP6.0 arrays.” *J Mol Diagn.* 12(2): 184–196.
- 42) **Hallek M.** (2017) “Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment”. *Am J Hematol.*;92(9):946-965. doi: 10.1002/ajh.24826
- 43) **Hallek M.**, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; (2008) “International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines”. *Blood*;111(12):5446-56.
- 44) **Hamblin TJ**, Orchard JA, Ibbotson RE et al. (2002) “D38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease”. *Blood.*;99(3):1023-9.
- 45) **Han T**, Ohtaki K, Sadamori N, Block AW, Dadey B, Ozer H, Sandberg AA (1986) “Cytogenetic evidence for clonal evolution in B-cell chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer Genet Cytogenet.*;23(4):321-8
- 46) **Houldsworth J.**, Guttapalli A., Thodima V., Yan X.J., et al (2014) “Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Leuk Lymphoma.*;55(4):920-8.
- 47) **Howlader** et al. National Cancer Institute (web site). Surveillance Epidemiology and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets: Chronic Lymphocytic Leukemia. Available at <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>. Accessed: May 31, 2018.
- 48) **Huang S.J.**, Bergin K., Smith A.C., Gerrie A.S., Bruyere H., et al (2017) “Clonal evolution as detected by interphase fluorescence in situ hybridization is associated with worse overall survival in a population-based analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia in British Columbia, Canada”. *Cancer Genet.*;210:1-8.
- 49) **Janssens A.**, Van Roy N., Poppe B., Noens L., et al (2012) “High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence in situ hybridization study and review of the literature” *Eur J Haematol.*;89(1):72-80.
- 50) **Kay N.E.**, Eckel-Passow JE, Braggio E, Vanwier S, Shanafelt TD, Van Dyke DL et al., (2010) “Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy”. *Cancer Genet Cytogenet*; 203(2):161-8.
- 51) **Kikushige Y.** et al., (2011) “Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer Cell* 20, 246-259, 2011.
- 52) **Kipps T.J.**, Stevenson F.K., Wu C.J., Croce C.M., Packham G., Wierda W.G., O'Brien S., Gribben J. and Rai K. (2017). “Chronic lymphocytic leukaemia.” *Nature Reviews Disease Primers*; 3:16096.
- 53) **Klein U.**, Lia M., Crespo M., Siegel R., Shen Q., et al. (2010) “The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer Cell.*;17(1):28-40
- 54) **Kolialexi A.**, Tsangaris G.T., Kitsiou S., et al (2005). “Impact of cytogenetic and molecular cytogenetic studies on hematologic malignancies”. *Anticancer Res.*;25(4):2979-83.

- 55) **Krober A.**, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer (2002) “SV(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia” *Blood*;100:1410-1416.
- 56) **Landau D.A.**, Carter SL., Stojanov P, McKenna A, et al (2013) “Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia,” *Cell.*;152(4):714-26.
- 57) **Langerak A.W.**, Davi F., Ghia P., Hadzidimitriou A., Murray F., Potter K.N., Rosenquist R., Stamatopoulos K., Belessi C. (2011) “Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases.” *Leukemia.* 25(6):979-84.
- 58) **Lawrie C.H.** (2013) “MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review.” *Br J Haematol*;160(5):571-81. Review
- 59) **Lupski J.R.** (2015) “Structural Variation Mutagenesis of the Human Genome: Impact on Disease and Evolution”. *Environ Mol Mutagen.* 2015; 56(5): 419–436
- 60) **Majid A.**, Lin TT, Best G, Fishlock K, Hewamana S, Pratt G, Yallop D, Buggins AG, Wagner S, et al., (2011) “CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL”. *Leuk Res.*;35(6):750-6.
- 61) **Malavasi F.**, Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., et al., (2008) “Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology”. *Physiol Rev.*88(3):841-86.
- 62) **Malek S.N.** (2013) “The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia”. *Oncogene.* 32(23): 2805–2817
- 63) **Marti G.E.**, Rawstron AC, Ghia P., et al. (2005) “Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis”. *J Haematol.*; 130(3):325-332.
- 64) **Martín-Subero J.**, Ibbotson R, Klapper W, et al. (2007) “A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation”. *Leukemia.*21: 1532-44.
- 65) **Matutes E.**, Attygalle A, Wotherspoon A, Catovsky D. (2010) “Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)”. *Best Pract Res Clin Haematol.*;23(1):3-20.
- 66) **Mayr C.**, Michael, R, et al. (2006) “Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia” *Blood* 107:742-751
- 67) **Messina M.**, Del Giudice I, Khiabani H et al. (2014) “Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemo-refractoriness”. *Blood:* 123(15):2378-88
- 68) **Messmer B.T.**, Messmer D, Allen SL et al. (2005) “In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells”. *J Clin Invest*;115(3):755-64.
- 69) **Mian M.**, Rinaldi A., Mensah A.A., Rossi D., Ladetto M., et al (2013) “Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH”. *Ann Oncol.*;24(5):1378-84.
- 70) **Michaux L.**, Dierlamm J, Wlodarska I et al. (1997) “t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: a review of 23 cases”. *Cancer Genet Cytogenet.*;94(1):36-43.
- 71) **Montillo M.**, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. (2005) “Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies”. *Haematologica.* 90(3):391-9. Review.
- 72) **Moreno C.**, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Martino R, Nomdedeu J, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Sierra J, Montserrat E (2005) “Allogeneic stem-cell transplantation may overcome the adverse prognosis of unmutated VH gene in patients with chronic lymphocytic leukemia”. *J Clin Oncol*;23:3433-3438.
- 73) **Nadeu F.**, Delgado J., Royo C., Baumann T., et al., (2016) “Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1 and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia” *Blood:* 659144

- 74) **Neal S. Young.** Aplastic Anemia: (2010) “Telomere Biology and Telomere Diseases: Implications for Practice and Research”. *Hematology*:30-35
- 75) **Nowakowska B.,** Bocian E. (2004) “Molecular cytogenetic techniques and their application in clinical diagnosis”. *Med Wieku Rozwoj.*;8(1):7-24.
- 76) **Nowakowski G.S.,** Dewald GW, Hoyer JD, et al. (2006). “Interphase fluorescence in situ hybridization with an IGH probe is important in the evaluation of patients with a clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*; 30:36–42.
- 77) **O’Keefe C.,** McDevitt M.A., Maciejewski J.P. et al (2010) “Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies”. *Blood*; 115(14):2731-9
- 78) **O’Malley D.P.,** Giudice C, Chang AS, Chang D, Barry TS, Hibbard MK, Chen R, Chen ST (2010). “Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia.” *Int J Lab Hematol.*;33(3):238-44.
- 79) **Orlandi E.M.,** Bernasconi P et al. (2013) “Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH”. *Hematological Oncology* 31, 136-142
- 80) **Oscier D.G.,** M.J. Rose-Zerilli, N. Winkelmann, D. Gonzalez de Castro, B. Gomez, J. Forster, et al. (2013) “The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial.” *Blood*, 121:468-475.
- 81) **Ouillette P,** Saiya-Cork K, Seymour E et al. (2013) “Clonal evolution, genomic drivers, and effects of 97 therapy in chronic lymphocytic leukemia”. *Clin Cancer Res.*;19(11):2893-904.
- 82) **Ouillette P.,** Collins R., Shakhani S., Li J., Peres E., et al., (2011) “Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood*. 15;118(11):3051-61.
- 83) **Parikh S.A.,** T.D. Shanafelt T.D. (2016) “Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia”. *Seminars in Oncology* 43: 233-240
- 84) **Parker H.,** Rose-Zerilli MJ, Parker A et al. (2011) “13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*”;25(3):489-97.
- 85) **Patel A.,** Kang SH, Lennon PA, Li YF, Rao PN, Abruzzo L, Shaw C, Chinault AC, Cheung SW. “Validation of a targeted DNA microarray for the clinical evaluation of recurrent abnormalities in chronic lymphocytic leukemia”. *Am J Hematol.* 2008 Jul;83(7):540-6.
- 86) **Pinkel D.,** Donna G Albertson. (2005) “Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature Genetics*:37, pages S11–S17.
- 87) **Puiggros A.,** Blanco G., Espinet B. (2014) “Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go”. *Biomed Res Int*;2014:435983.
- 88) **Puiggros A.,** Puigdecenet E., Salido M., Ferrer A., et al (2013) “Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization techniques?” *Leuk Lymphoma*;54(5):986-95.
- 89) **Put N.,** P Meeus, B Chatelain, K Rack, et al. (2009) “Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia.” *Leukemia* 23, 1201–1204
- 90) **Rai K.R.,** Jain P. (2016) “Chronic lymphocytic leukemia (CLL)—Then and now”, *Am. J. Hematol.*,9 (3): 330-340.
- 91) **Rai K.R.,** Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S., (1975) “Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia”. *Blood*,46, 219-234.
- 92) **Reda G.,** Cassin R., Fattizzo B., Giannarelli D., Mattiello V., et al (2017) “Chronic lymphocytic leukemia and prognostic models: A bridge between clinical and biological markers”. *Am J Hematol.* 2017;92(7) E135-E137
- 93) **Rigolin G.M.,** Saccenti E., Bassi C., Lupini L., et al., (2016) “Extensive next-generation sequencing analysis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations”. *J Hematol Oncol.* 15;9(1):88.

- 94) **Rinaldi A**, Mian M, Kwee I et al. (2011) “Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia”. *Br J Haematol*;154(5):590-9.
- 95) **Ringshausen I**, Schneller F., Bogner C. et al. (2002) “Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta”. *Blood*;100(10):3741-8
- 96) **Rodríguez A.E.**, Robledo C., García J.L., González M., et al (2012) “Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling”. (2012) *Ann Oncol.*;23(8):2138-46.
- 97) **Rodríguez-Vicente A.E**, Bikos V., Hernández-Sánchez M., Malcikova J., Hernández-Riva J.M. and Pospisilova S. (2017) “Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: recent findings and new horizons”. *Oncotarget*. 2017 Sep 19; 8(41): 71234–71248.
- 98) **Rodríguez-Vicente A.E.**, Díaz M.G., Hernández-Rivas J.M. (2013) “Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease”. *Cancer Genet.* (3):49-62.
- 99) **Roos-Weil D.**, Nguyen-Khac F., Bernard O.A. (2016) “Chronic lymphocytic leukemia: Time to go past genomics?” *Am J Hematol.*;91(5):518-28.
- 100) **Rossi D.**, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. (2009) “The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness”. *Clin Cancer Res.*;15(3):995–1004.
- 101) **Rossi D.**, Khiabani H, Spina V et al. (2014) “Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia” *Blood* 3;123(14).
- 102) **Scheinin I.**, Sie D., Bengtsson H., Van de Wiel M.A., Olshen A.B., Van Thuij H.F., Van Essen H. F., Eijk P.P., et al “DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly”. *Genome Res.* 2014;24(12): 2022–2032
- 103) **Schoumans J.**, Suela J., Hastings R., Muehlematter D., et al (2016) “Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders” *Gene Chromosomes Cancer.* 55(5):480-91.
- 104) **Schouten J.P.**, McElgunn C.J., et al (2002). “Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification”. *Nucleic Acids Res.*;30(12):e57.
- 105) **Schultz R.A.**, Delioukina M., Gaal K., Bedell V., Smith D.D., et al., (2011) “ Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by BAC-based microarray analysis”. *Mol Cytogenet.* 3;4(1):1755-8166.
- 106) **Shaffer LG**, McGowan-Jordan J, Schmid M. (2016). *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.*
- 107) **Shahjehani M.**, Mohammadiasl J. (2015) “Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis”. *Cell. Oncol.*38:93-109
- 108) **Shanafelt T.D.**, Jenkins G et al. (2009) “Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer*;115:363–72.53
- 109) **Shanafelt T.D.**, Witzig T.E., Fink S.R., Jenkins R.B., et al (2006) “Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia” *J Clin Oncol.* 2006;24(28):4634-41.
- 110) **Stevens-Kroef M.J.**, Van Den Berg E., Olde W. D., Van Kessel A., Pfundt R. (2014). “Identification of prognostic relevant chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia using microarray-based genomic profiling”. *Mol Cytogenet.* 9;7(1):3
- 111) **Stilgenbauer S.**, Sander S, Bullinger L, et al. (2007) “Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival”. *Haematologica*;92:1242e1245.
- 112) **Strati P.**, Jain N., O'Brien S. (2018). “Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment”. *Mayo Clin Proc.*;93(5):651-664.

- 113) **Strati P.**, Shanafelt TD. Monoclonal (2015) “B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification”. *Blood*; 126(4):454-462
- 114) **Swerdlow S.H.**, Campo E., Pileri S.A., et al. (2016) “The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.” *Blood*;127(20):2375-2390.
- 115) **Thomay K.**, Caroline F. , Winfried Hofmann W. et al (2017) “Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions”. *Ann Hematol* 96(9):1493-1500.
- 116) **Thompson P.A.**, O’Brien S.M., Wierda W.G., et al (2015) “Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*;121:3612-3621.
- 117) **Tuna M.**, Knuutila S., Mills G.B. et al (2009) “Uniparental disomy in cancer” *Trends Mol Med*. 15(3):120-8. 2009
- 118) **Van Dyke D.L.**, Lillian Werner, et al. (2016) “The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience”. *British Journal of Haematology*. 173, 105–113.
- 119) **Vasconcelos Y.**, Davi F., Levy V., Oppezzo P., Magnac C., et al, (2003) “Staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.” *J Clin Oncol*;21(21):3928-32
- 120) **Wang L.**, Wheeler D.A., Prchal J.T. (2016) “Acquired uniparental disomy of chromosome 9p in hematologic malignancies”. *Exp Hematol*.;44(8):644-52.
- 121) **Wawrzyniak E.**, Kotkowska A., Blonski J.Z., Siemieniuk-Rys M., et al (2013) “Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance”. *Eur J Haematol*.;92(2):91-101.
- 122) **Wierda W.**, O'Brien S, Wen S, Faderl S, et al (2005) “Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia”. *J Clin Oncol* 2005;23:4070-4078.
- 123) **Wierda WG**, O'Brien S, (2007) “Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Blood*, 109:4679-85
- 124) **Wiestner A.**, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, et al. (2003) .” ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile”. *Blood*.;101(12):4944-51.
- 125) **Xose S. P.**, Jares P. and Campo E. (2018). “Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: Crossroads of genetic and microenvironment interactions”. *Blood*. 131(21):2283-2296
- 126) **Xose S.P.** and López-Otín C. (2013) “The evolutionary biography of chronic lymphocytic Leukemia” *Nat Genet*.;45(3):229-31.
- 127) **Xu X.**, Johnson EB, Leverton L, Arthur A, Watson Q, Chang FL, Raca G, Laffin JJ (2013). “The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies--a comparative study of three genetic testing methods. *Cancer Genet*.(9-10):317-26.
- 128) **Yi S.**, Li Z., Zou D., An G., Cui R., Zhong S., Li H., et al (2016). “Intratumor genetic heterogeneity and number of cytogenetic aberrations provide additional prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia.” *Genet Med*. 2017;19(2):182-191.
- 129) **Zenz T**, Fröhling S, Mertens D et al. (2010) “Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)”. *Best Pract Res Clin Haematol*;23(1):71-84.
- 130) **Zenz T.**, Häbe S, Denzel T et al. (2009) “Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial.” *Blood*;114(13):2589-97